

Struktur und biologische Wirkung der
Azadirachtine, einer Gruppe insekten-
spezifischer Wachstumshemmer aus Neem
(*Azadirachta indica*)

Untersuchung ihrer Struktur-Wirkungs-
Beziehung am Mexikanischen Bohnenkäfer
(*Epilachna varivestis*)

Hans Forster

Disbui. München

1987

Struktur und biologische Wirkung der Azadirachtine,
einer Gruppe insektenspezifischer Wachstums hemmer
aus Neem (Azadirachta indica)

Untersuchung ihrer Struktur-Wirkungs-Beziehung am
Mexikanischen Bohnenkäfer (Epilachna varivestis)

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Hans Forster
aus
Bad Heilbrunn
München, 1987

1. Berichterstatter: Prof.Dr.H.Rembold
 2. Berichterstatter: Prof.Dr.H.Wagner
- Tag der mündlichen Prüfung: 2.12.1987

Anfangs wollt' ich fast verzagen,
und ich glaubt, ich trüg es nie;
und ich hab' es doch getragen-
aber fragt mich nur nicht, wie?

Heinrich Heine

Für meine Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Zeit von Juni 1983 bis Juli 1986 ausgeführt.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. H. Rembold für sein unermüdliches Interesse am Fortgang meiner Arbeit, seinen Rat und seine wohlwollende und großzügige Unterstützung;

Herrn Prof. Dr. J. Sonnenbichler für wertvolle Diskussionen bei der Interpretation der 500 MHz-NMR-Spektren;

Herrn Prof. Dr. W. Schäfer für die Aufnahme der FAB-Massenspektren;

Herrn Dr. G. Bovermann für die Messung der 400 MHz-NMR-Spektren;

Herrn Dr. Ch. Czoppelt, Frau E. Woker und Frau D. Hagenguth für die Durchführung der biologischen Tests;

allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit.

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

COSY	correlated spectroscopy
CWD	continuous wave decoupling
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	distortionless enhancement by polarisation transfer
EI	electron impact
FAB	fast atom bombardment
FID	free induction decay
F.P.	Fließpunkt
HPLC	high pressure liquid chromatography
J	Kopplungskonstante
JH	Juvenilhormon
L ₄	Larve im vierten Stadium
M	Multiplizität
MC	Metamorphoseinhibierende Konzentration
MS	mass spectroscopy
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
ppm	parts per million (Konzentration, bezogen auf Einwaage)
PRFT	pulse relaxed Fourier transform
RP	reversed phase

Inhalt

	Seite
I. Einleitung	1
1. Allgemeines über Insekten und Insektizide	1
2. Theoretische Betrachtungen über Metamorphosehemmer als Insektizide	2
3. Ziel der Arbeit	5
II. Experimenteller Teil	6
1. Aufarbeitung von Neem-Nüssen	6
1.1. Schälen	6
1.2. Wasserbestimmung	6
1.3. Mahlen	6
1.4. Extraktion	6
1.5. Kieselgel-Filtration	7
1.6. Verteilung zwischen Hexan/Methanol/Wasser	8
1.7. Säulenchromatographie an Kieselgel-RP-8	8
1.8. Präparative HPLC	8
Isolierung von Azadirachtin A und B	9
1.9. Isolierung von weiteren Inhaltsstoffen	9
1.9.1. Halbpräparative HPLC	10
1.9.1. Dünnschichtchromatographie	10
1.10. Isolierung der Azadirachtine C - G	10
1.10.1. Isolierung von Azadirachtin C	10
1.10.2. Isolierung von Azadirachtin D	11
1.10.3. Isolierung von Azadirachtin E	11
1.10.4. Isolierung von Azadirachtin F	12
1.10.5. Isolierung von Azadirachtin G	12



	Seite
2. Darstellung von Derivaten	12
2.1. Derivate von Azadirachtin A	13
2.1.1. 22,23-Dihydroazadirachtin A	13
2.1.2. 11-Acetylazadirachtin A	13
2.1.3. 3-Deacetylazadirachtin A	14
2.1.4. 23 α -Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A und 23 β -Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A	14
2.2. Derivate von Azadirachtin B	15
2.2.1. 22,23-Dihydroazadirachtin B	15
2.2.2. 3-(2-Methyl-butryl)-3-detigloyl-azadi- rachtin B	15
2.2.3. 3-Detigloylazadirachtin B	15
2.2.4. 23 α -Ethoxy-13,14-deepoxy-22,23-dihydro- azadirachtin B	16
3. Biologischer Test	16
4. Benützte Geräte	17
III. Ergebnisse und Diskussion	19
1. Isolierung der Azadirachtine A - G aus Neemnüssen	19
2. Strukturaufklärungen	23
2.1. Struktur von Azadirachtin A	23
2.2. Charakterisierung der Azadirachtine durch verschiedene Mehrspinsysteme	25
2.3. Struktur von Azadirachtin B	29
2.4. Struktur von Azadirachtin C	31
2.5. Struktur von Azadirachtin D	34
2.6. Struktur von Azadirachtin E	36
2.7. Struktur von Azadirachtin F	37
2.8. Struktur von Azadirachtin G	39
2.9. Struktur weiterer Neem-Inhaltsstoffe	41

	Seite
3. Derivate von Azadirachtin A und Azadirachtin B	42
3.1. 22,23-Dihydroazadirachtin A	42
3.2. 22,23-Dihydroazadirachtin B	43
3.3. 3- Detigloyl-3- (2-methylbutyryl)- 22,23- dihydroazadirachtin B	44
3.4. 11-Acetylazadirachtin A	44
3.5. 3-Deacetylazadirachtin A	46
3.6. 3-Detigloylazadirachtin B	47
3.7. 23- α Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A und 23- β Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A	48
3.8. 23- α Ethoxy-13,14-deepoxy-17-hydroxy-22,23- dihydroazadirachtin B	49
4. Der biologische Test	51
4.1. Allgemeines	51
4.2. Das Testsystem	51
4.3. Toxische Wirkung	52
4.4. Fraßhemmung	52
4.5. Wachstumsstörungen durch Azadirachtin	54
4.6. Quantitative Auswertung der Wachstumstests	55
4.7. Beispiel für die Ermittlung eines MC ₅₀ -Werts	56
4.8. Ergebnis der Epilachna-Tests	58
5. Struktur-Wirkungs-Beziehungen	61
5.1. Substituenten an Ring A und B	62
5.2. Untersuchung des Furan-Teils C-20 - C-23	64
5.3. Auswirkungen von Änderungen an C-11	66
5.4. Auswirkung von Änderungen im Bereich C-13 - C-20	67
5.5. Zusammenfassung der Struktur-Wirkungs- Beziehungen	69
5.6. Ausblick	70
IV. Zusammenfassung	71
V. Literatur	73
VI. Anhang	81

I. Einleitung

I.1. Allgemeines über Insektizide

Als Schädlinge konkurrieren viele Insekten mit dem Menschen um die Nahrung oder sie sind Überträger gefährlicher Krankheiten. Weltweit schätzt man den Schaden, den Insekten verursachen auf rund 50 Milliarden DM pro Jahr¹.

Zur Insektenbekämpfung werden seit etwa 100 Jahren synthetische Insektizide verwendet. Die bekanntesten der neuen Generation sind die chlorierten Kohlenwasserstoffe, wie DDT, Aldrin und Lindan. Diese Stoffe sind auch für den Menschen giftig und verursachen wegen ihres langsamen Abbaus große ökologische Schäden. Zusätzlich haben viele Insektenarten gegen die toxischen Insektizide Resistenz entwickelt.

Diese fortschreitende Resistenzbildung verlangt die Entwicklung von strukturell und in ihrem Wirkungsmechanismus neuen Insektiziden, die zudem ökologisch unbedenklich sein sollten. Wichtige Hinweise auf eine solche Art des Pflanzenschutzes gibt die Natur selbst und man versucht daher seit langem, Insektizide aus Pflanzen zu gewinnen^{2,3,4}. Schon 1690 wurden Tabakextrakte in England zum Töten von saugenden Insekten benutzt⁵. Eine andere Gruppe von insektenwirksamen Verbindungen kommt in den Wurzeln von Derris elliptica vor. Die wirksamste Substanz daraus ist das Rotenon, dessen Struktur 1932 aufgeklärt wurde⁶. Auf das Pyrethrin geht die Klasse der synthetischen Pyrethroide zurück, die zu den modernsten Insektiziden gehören. Pyrethrin ist der gegen Insekten wirksame Inhaltsstoff von Chrysanthemum cinerariaefolium.

Eine weitere Pflanze, aus der Insektizide isoliert werden können, ist der Neembaum(Azadirachta indica)⁷, der in Indien und Ostafrika weit verbreitet ist. Der Neembaum wird nur von wenigen Insekten befallen. Einige seiner Inhaltsstoffe wurden bereits vor Beginn der vorliegenden Arbeit chemisch

charakterisiert⁸⁻¹³, weitere während der Durchführung dieser Arbeit von anderen Arbeitsgruppen isoliert¹⁴⁻¹⁹. Im Neembaum sind wesentlich mehr als die bisher als insektizid wirkend beschriebenen Substanzen enthalten, deren Struktur und Wirkung noch geklärt werden muß.

Man fand sowohl eine fraß- wie auch eine metamorphosehemmende Wirkung bei Insekten²⁰⁻²³. Diese letztere, die Entwicklung beeinflussende Wirkung macht sie im Rahmen des integrierten Pflanzenschutzes und auch einer biologischen Schädlingsbekämpfung besonders interessant.

I.2. Theoretische Betrachtungen über Metamorphosehemmer als Insektizide

Im Verlauf der Imaginalentwicklung der Insekten schlüpft aus dem Ei eine Larve, die mehrere Stadien mit jeweils einer Häutung durchläuft. Bei den holometabolen Insekten verpuppt sich die Larve und aus dieser schlüpft das erwachsene Tier. Bei den hemimetabolen Insekten führt die letzte Larvenhäutung direkt zum erwachsenen Tier.

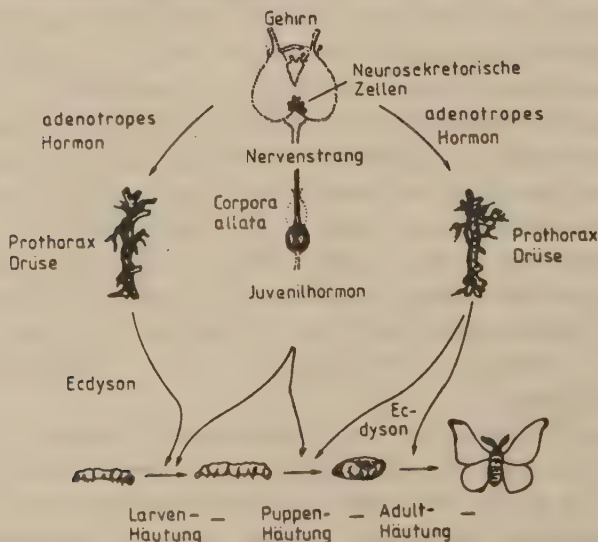


Abb.1. Wirkungsweise von Insektenhormonen. Im oberen Teil sind die hormonproduzierenden Drüsen dargestellt. Der untere Teil zeigt die Häutungen, die von den Hormonen kontrolliert werden (aus Karlson²⁴).

Die Häutungen (Abb. 1) werden unter anderem durch das Häutungshormon Ecdyson gesteuert, die Art der Häutung durch das Juvenilhormon (JH). Bei hohem JH-Titer führt die Häutung zum nächsten Larvenstadium, bei geringem JH-Titer zur Puppe und in Abwesenheit von JH häutet sich die Puppe zum erwachsenen Insekt²⁵.

Metamorphosehemmer sind Substanzen, die bei der Imaginalentwicklung eines Insekts das Wachstum oder bestimmte Entwicklungsprozesse verändern, ohne direkt toxisch zu wirken²⁶. Die meisten bekannten Hemmstoffe wirken gegen das Zusammenspiel der Insektenhormone. Wegen ihrer verzögerten Wirkung sind sie nützlich, um den Populationsanstieg der nachfolgenden Generation zu verringern.

Die Konzentration von Juvenilhormon und Ecdyson ändert sich vor der Häutung der Insektenlarve zum nächsten Stadium. An dieser Stelle setzen synthetische Wachstumshemmer an.

a) Juvenilhormone und Analoge: Die Häutung zum erwachsenen Tier läuft nur ab, wenn der JH-Spiegel auf Null absinkt. Gibt man künstlich JH, so folgt der letzten Larvenhäutung eine überzählige Häutung statt einer Verpuppung. Da Juvenilhormone labile Verbindungen sind, ist ihre praktische Anwendung als Insektizid nicht möglich. Es gibt jedoch Substanzen mit einfacherer und stabilerer Struktur, welche wie JH wirken (Juvenioide).

b) Ecdyson: Eine erhöhte Konzentration dieses Hormons im Tier veranlaßt eine Häutung zum nächsten Entwicklungsstadium. Wird die Wirkung des Ecdysons durch Gabe von strukturverwandten, aber inaktiven Stoffen unterdrückt, so erfolgt keine weitere Häutung. Die Häutungshormone (Ecdyson und 20-Hydroxy-Ecdyson) haben ein Steroidgerüst, das nur schwer und deshalb für die praktische Anwendung zu teuer zu synthetisieren ist. Die Häutungshormone haben deshalb für den Pflanzenschutz keine Bedeutung.

c) Azadirachtin: Inhaltsstoff des Neembaums

Krishnamurti und Rao²⁷ erwähnen zum ersten Mal, daß Neemblätter, mit gelagertem Getreide vermischt, Insekten abschrecken. Mit Hilfe eines Fraßtests an der Wüstenheuschrecke, Schistocerca gregaria, konnten Butterworth und Morgan 1968 die am stärksten fraßhemmende Substanz, die sie als Azadirachtin bezeichneten, aus Neemkernen isolieren^{28,29}. In der Folgezeit bis zum Beginn dieser Arbeit waren bereits viele biologische Untersuchungen mit Azadirachtin durchgeführt worden³⁰⁻⁴³.

Bis 1975 war Azadirachtin nur als Fraßhemmer bekannt. Steets und Schmutterer³³ verfütterten mit Azadirachtin behandelte Bohnenpflanzen an den Mexikanischen Bohnenkäfer, Epilachna varivestis. Er ist ein holometaboles Insekt und wird durch Azadirachtin nicht vom Fraß abgehalten. Als Folge der Azadirachtinbehandlung fanden sie aber eine um 90% geringere Vermehrung und eine Verzögerung der Eiablage. Rembold et al.^{34,35,36} fanden eine Wachstumsstörung bei drei holometabolen Insekten (Epilachna varivestis, Ephestia kuehniella, Apis mellifica). Die Imaginalentwicklung war gestört und eine hohe Mortalität wurde schon im Puppenstadium beobachtet. Diese wachstumshemmende Wirkung bei Larven sowie die Hemmung der Eireifung bei Erwachsenen wurde noch bei einer Vielzahl anderer Insekten beobachtet³⁰⁻⁵⁹ und während der Anfertigung dieser Arbeit veröffentlicht⁴⁴⁻⁵⁹.

Die Azadirachtinwirkung wurde als eine Störung des Häutungshormonspiegels interpretiert. Azadirachtin rief die gleichen Effekte hervor wie das Phytoecdysen Cyasteron und Ecdysteron³⁸. Die Wirkung von Azadirachtin wurde bei einem saugenden Insekt (Rhodnius prolixus) verhindert, wenn dem Futter ATP, Ecdyson oder ein Juvenilhormon-Analogen beigemischt war^{46,47}.

I.3. Ziel der Arbeit

a) Mit Hilfe eines Insektenwachstumstests sollten aus Neem-Samen Azadirachtin und andere biologisch aktive Substanzen, die metamorphosestörende Eigenschaften besitzen, isoliert und gereinigt werden. Dabei sollten nur solche Extrakte fraktioniert werden, die bei Epilachna Wachstumsstörungen ohne gleichzeitige Fraßhemmung auslösen. Aus Vorversuchen war bekannt, daß über die in der Literatur beschriebenen Substanzen hinaus noch weitere gegen Insekten aktive Substanzen in Neem enthalten sind.

b) Mit analytischen und besonders mit spektroskopischen Methoden sollte die Struktur der bis dahin unbekannten Neem-Inhaltsstoffe mit metamorphosestörender Wirkung aufgeklärt werden. Für Azadirachtin war ein Strukturvorschlag von Zanno et al.⁶⁰ veröffentlicht, den im Verlauf dieser Arbeit Kraus et al.⁶¹ und Broughton et al.⁶² modifizierten.

c) Die biologische Wirkung aller in dieser Arbeit isolierten und in der Struktur aufgeklärten Naturstoffe sollte quantifiziert werden. Hierzu war es nötig, den gewählten Biotest unter Zuhilfenahme eines Rechenprogramms in statistisch signifikanter Weise auszuwerten, um unterschiedliche biologische Wirkungen (Entwicklungshemmung, Fraßhemmung etc.) differenzieren zu können.

d) Ein Vergleich der Strukturen aller isolierten Verbindungen und ihrer quantifizierten biologischen Aktivität sollte dazu führen, die für die metamorphosestörende Wirkung wesentlichen Strukturelemente der Neem-Inhaltsstoffe zu erkennen. Zusätzlich zu diesem Vergleich sollten Derivate der Naturstoffe angefertigt werden.

e) Als Ergebnis dieser Arbeiten wird ein hypothetisches Molekülmodell entwickelt, das die als relevant erkannten Teilstrukturen der als Azadirachtine zusammengefaßten Wirkstoffe enthält und damit eine Diskussion über ein einfacheres, synthetisches "biologisches Insektizid" erlaubt.

II. Experimenteller Teil

II.1. Aufarbeitung von Neemnüssen

Schemadarstellung der Aufarbeitung siehe S.20.

1.1. Schälen

57 kg Neemnüsse wurden in einer Weizenentspelzungsanlage von den Schalen befreit. Dabei wurden die harten Schalen zerbrochen. Die Kerne sind flexibler und überstehen die Prozedur unbeschadet. Die Trennung der Schalenteile und der Kerne erfolgte in einer Windsichtungsanlage. Die Schalen (30 kg) enthalten kein Azadirachtin. Sie wurden verworfen. Die Aufarbeitung wurde mit den Kernen (27 kg) fortgesetzt.

1.2. Wasserbestimmung

Die Kenntnis des Wassergehaltes ist wichtig für die anschließende Extraktion, da zuviel Wasser hinderlich ist. In den Neemkernen war nur etwa 5% Wasser enthalten, somit konnte auf eine Trocknung verzichtet werden.

Der Wassergehalt der Neemkerne wurde thermisch und mit der Karl-Fischer-Titration bestimmt:

a) thermisch:

Die Neemkerne wurden gemahlen, mit geglühtem Seesand vermischt und 4 Stunden bei 120 °C getrocknet.

Der Wassergehalt betrug $4,5 \pm 0,5$ %.

b) Karl-Fischer-Titration: Die Bestimmung nach dieser Methode ergab einen Wassergehalt von $5,1 \pm 0,2$ %.

1.3. Mahlen

Um für die anschließende Extraktion bessere Voraussetzungen zu schaffen, wurden die Neemnüsse mit einer Getreidemühle gemahlen. Das ölige Pulver wurde möglichst schnell extrahiert, um enzymatische Reaktionen zu vermeiden.

1.4. Extraktion

Die 27 kg gemahlene Neemkerne wurden in 5 Portionen aufgeteilt. Jede Charge wurde zweimal mit 10 l techn. Hexan

2 Stunden gerührt. Die Apparatur war gegen statische Aufladung geerdet. Zum Rühren wurde ein Preßluftührer verwendet. Der Gasraum in dem 20 l Kolben wurde ständig mit Luft gespült. Dadurch konnte kein zündfähiges Gemisch entstehen. Danach wurde filtriert. Die Extrakte der einzelnen Portionen wurden vereinigt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels blieben 12,0 kg Neemöl und 15 kg entöltes Neempulver zurück. Das Pulver wurde in drei Portionen geteilt und in der gleichen Apparatur je zweimal mit je 10 l techn. Aceton extrahiert. Die vereinigten Acetonextrakte hatten ein Gewicht von 1670 g.

Eine Analyse mit Dünnschichtchromatographie zeigte, daß Azadirachtine nur in der Acetonfraktion enthalten waren.

1.5. Kieselgel-Filtration

Die vereinigten Aceton-Fraktionen wurden in Methanol gelöst und mit 1500 g Kieselgel vermischt. Das Methanol wurde abdestilliert. Die Acetonfraktion verblieb auf dem Kieselgel.

Zur Filtration wurde eine Säule von 30 cm Länge und 10 cm Durchmesser mit Kieselgel gefüllt. Die an Kieselgel adsorbierte Acetonfraktion (1,6 kg) wurde in fünf Portionen aufgeteilt. Jede Portion wurde auf der oben genannten Kieselgel-Säule mit zwei verschiedenen Petrolether/Essigester-Gemischen eluiert.

Zuerst wurde mit 4 l Petrolether/Essigester (7:3), dann mit 4 l Petrolether/Essigester (1:4) eluiert. Die Kieselgelsäule wurde danach mit Methanol regeneriert und konnte wieder verwendet werden.

Die DC zeigte, daß die erste Fraktion fast nur aus sehr unpolarem Material bestand. Die zweite Fraktion enthält die Azadirachtine neben einer ganzen Reihe anderer Substanzen.

Ausbeute: 1. Fraktion: 1140 g
2. Fraktion: 170 g

1.6. Verteilung zwischen Hexan/Methanol/Wasser

In der zweiten Petrolether/Essigesterfraktion waren noch unpolare Substanzen enthalten, die sich im Gegensatz zu den Azadirachtinen in Hexan lösten. Die zweite Fraktion wurde deshalb in zwei Portionen zwischen den beiden Phasen von Methanol/Wasser/Hexan (4:1:5) verteilt. Dabei wurden Azadirachtine in die Hexanphase verschleppt. Die Hauptmenge (etwa 95%) war in der Methanol-Phase.

Ausbeute:	Hexan-Fraktion	79 g
	Methanol-Fraktion	88 g

1.7. Säulenchromatographie an Kieselgel-RP-8

Für diese Chromatographie wurde eine Säule von 300 mm Länge und 25 mm Durchmesser benutzt, die mit 100 g SiO_2 -RP-8-Material (Lichroprep, Merck) gefüllt war. Für jeden Lauf wurden 7 g der Methanolfraktion aus dem vorhergehenden Reinigungsschritt eingesetzt. Die auf Kieselgel aufgetragene Substanz wurde mit Methanol/Wasser (7:3) eluiert. Von Beginn der Elution an wurden 15 ml-Fraktionen gesammelt (Elutionsdauer 10 Minuten). Die einzelnen Fraktionen wurden vom Lösungsmittel befreit, gewogen und mit Dünnschichtchromatographie auf ihren Azadirachtin Gehalt analysiert. Die Fraktionen, in denen Azadirachtine enthalten waren, wurden vereinigt. Diese Chromatographie wurde achtmal wiederholt und daraus 15,5 g Azadirachtin-haltiges Material gewonnen. Die Dünnschichtchromatographie der vereinigten Eluate zeigte, daß in der Azadirachtin-Fraktion noch mehrere andere Substanzen enthalten waren. Azadirachtin A zeichnete sich jedoch, zusammen mit Azadirachtin B, bereits in diesem Reinigungsschritt als die Hauptschubstanz ab mit einem Verhältnis von 5:1 der beiden Substanzen.

1.8. Präparative HPLC

Die präparative HPLC wurde dazu benutzt, die Azadirachtine A und B zu trennen. Dafür wurde eine LATEK-Säule, gefüllt mit Kieselgel-RP-18-Material, mit einer Länge von 540 mm und einem Innendurchmesser von 54 mm eingesetzt. Die

Durchflußrate betrug 55 ml/min, mit Methanol/Wasser (43:57) als Laufmittel. Für jeden Lauf wurden etwa 5 g der Azadirachtin A-Fraktion aus der Säulenchromatographie an Kieselgel-RP-8 auf die Säule aufgetragen. Alle 9 Minuten wurde die Vorlage gewechselt, was einem Volumen von etwa 500 ml entsprach.

Unter diesen Bedingungen wurde das Maximum von Azadirachtin A nach 284 Min. eluiert. Das Maximum von Azadirachtin B erschien nach 397 Min. Trotz dieses großen Zeitunterschieds sind die beiden Substanzen auf der Basislinie nur wenig getrennt, weil der Peak von Azadirachtin A eine Basisbreite von 110 Min., der von Azadirachtin B eine von 80 Min. hat.

Isolierung von Azadirachtin A und Azadirachtin B

Jede einzelne Fraktion wurde mit analytischer HPLC auf ihre Reinheit sowie gegebenenfalls auf Art und Menge der Verunreinigungen untersucht. Komponenten, die in geringer Menge vorlagen und die den Azadirachtinen A und B ähnlich waren, konnten mit dieser präparativen HPLC nicht aufgetrennt werden und erschienen in den Flanken der beiden Hauptpeaks; reines Azadirachtin A und Azadirachtin B waren nur in den Fraktionen um das jeweilige Peakmaximum enthalten

Azadirachtin A: F.P. 156-158°C, $\lambda_{\max}$ 212,2 nm
($\epsilon=11919 \text{ cm}^2/\text{Mol}$) Ausbeute: 3500 mg

Azadirachtin B: F.P. 149-152°C, $\lambda_{\max}$ 211,8 nm
($\epsilon=13190 \text{ cm}^2/\text{Mol}$) Ausbeute: 700 mg

1.9. Isolierung von weiteren Inhaltsstoffen

Die Nebenfraktionen der präparativen HPLC wurden mit DC oder halbpräparativer HPLC im kleineren Maßstab weiter aufgetrennt. Dadurch wurden fünf weitere Azadirachtine aus Neemsamen isoliert.

Vergleiche dazu die schematische Darstellung auf Seite 20.

1.9.1. Halbpräparative HPLC

Die Trennungen wurden mit zwei hintereinander geschalteten HPLC-Säulen von jeweils 25 cm Länge und 8 mm Durchmesser durchgeführt. Bei den Nebenfraktionen der präp. HPLC lagen die Substanzen meistens sehr dicht zusammen, so daß jeweils höchstens 15 mg des Gemisches aufgetragen werden konnten. Durch vielfache Wiederholung des Vorgangs wurde soviel Reinsubstanz isoliert, daß Strukturanalysen durchgeführt werden konnten.

1.9.2. Dünnschichtchromatographie

Das Gemisch wurde auf mehreren SiO_2 -DC-Platten aufgetrennt. Die Nebenfraktionen der präp. HPLC enthielten etwa 15 - 20 verschiedene Substanzen, deren Reinigung in mehreren Schritten vorgenommen wurde. Für jeden nachfolgenden Reinigungsschritt wurden Platten mit geringerer Schichtdicke benützt. Die Vortrennung erfolgte auf Platten mit 2 mm Schichtdicke. Die Beladbarkeit betrug hier etwa 100 mg Substanz pro Platte. Die dann verwendeten 0,5 mm dicken Platten wurden mit 30 mg Gemisch beladen. Die Feintrennung wurde mit 0,25 mm-Platten durchgeführt, wobei hier die Grenze der Beladbarkeit bei etwa 10 mg Gemisch lag.

1.10. Isolierung der Azadirachtine C - G

1.10.1. Isolierung von Azadirachtin C

Die Isolierung erfolgte mit Dünnschichtchromatographie aus der Azadirachtin A-Fraktion der präp. HPLC.

32 mg dieser Fraktion wurden auf 4 SiO_2 -Platten (20x20cm, Schichtdicke 0,5mm) aufgetragen und mit CHCl_3 /Aceton (7:3) chromatographiert. Azadirachtin C mit R_f 0,46 wurde in einer Ausbeute von 4,7 mg erhalten. Zur Überprüfung der Reinheit wurde die Substanz mit mehreren Lösungsmittelsystemen chromatographiert, wobei jeweils nur eine Substanz zu erkennen war.

Laufmittel	R_f
Hexan/Essigester (3:2) auf SiO_2 -HPTLC	0,15
CHCl_3 /Aceton (7:3) auf SiO_2 -HPTLC	0,46
Ether/Aceton (4:1) auf SiO_2 -HPTLC	0,26

In der HPLC hatte Azadirachtin C eine 1,74-fache Retentionszeit im Vergleich zu Azadirachtin A.

Laufmittel: Methanol/Wasser (4:6); Durchfluß 1,0 ml/Min.;

Säule 100x5 mm, 3 μm -RP-18-Material; Detektion: UV 215 nm.

F.P. 134 - 135 °C, λ_{max} 202,5 nm (ϵ =25280 cm²/Mol)

1.10.2. Isolierung von Azadirachtin D

Azadirachtin D ist polarer als Azadirachtin A. Zusammen mit dem unpolaren Azadirachtin B ist es jedoch die Substanz, die dem Azadirachtin A chromatographisch am nächsten kommt. Die Isolierung erfolgt aus einer polaren Fraktion der präp. HPLC. In dieser Fraktion waren noch mehrere Substanzen enthalten. Die Isolierung in einem Schritt war nicht möglich. Zwischen der präparativen HPLC und der abschließenden DC wurde eine halbpräparative HPLC durchgeführt. Bei diesem Schritt wurde eine Fraktion erhalten, in der Azadirachtin D im Überschuß vorlag. Mit der DC konnte im Anschluß daran die saubere Substanz erhalten werden.

Laufmittel: CHCl_3 /Aceton (7:3) auf 0,5mm- SiO_2 -Platten, R_f 0,49.

Ausbeute 3,8 mg. F.P. 148 - 153 °C, λ_{max} = 210,0 nm (ϵ = 16670 cm²/Mol)

1.10.3. Isolierung von Azadirachtin E

Die Substanz wurde durch halbpräparative HPLC aus einer sehr polaren Fraktion der präp. HPLC isoliert.

Analytische Daten: DC mit SiO_2 -HPTLC-Platten

Laufmittel	R_f
CHCl_3 /Aceton (1:1)	0,43
CHCl_3 /Aceton (7:3)	0,24

In der HPLC hatte Azadirachtin E eine 0,41-fache Retentionszeit im Vergleich zu Azadirachtin A.

Laufmittel: Methanol/Wasser (2:3); Säule 100x5 mm,

Säulenmaterial: 3 μ m-SiO₂-RP-18

Ausbeute 9,4 mg. F.P. 166-168°C, $\lambda_{\max}$ 209,2 nm (ϵ = 8990 cm²/Mol)

1.10.4. Isolierung von Azadirachtin F

Die Substanz wurde aus einer polaren Fraktion der präp.HPLC isoliert. 20 mg dieser Fraktion wurden auf zwei 0,5mm-20x20 cm-SiO₂-Platten aufgetragen und mit dem Laufmittel CHCl₃/Aceton (7:3) chromatographiert. Die Bande mit R_f 0,27 wurde eluiert.

Analytik: Laufmittel: Methanol/Wasser (2:3); Säule 100x5 mm; 3 μ m-RP-18-Material. Azadirachtin F hatte eine 0,56-fache Retentionszeit im Vergleich zu Azadirachtin A.

Ausbeute 4,5 mg, FP 148-151°C,
 $\lambda_{\max}$ 208 nm (ϵ = 11917 cm²/Mol)

1.10.5. Isolierung von Azadirachtin G

Azadirachtin G wurde aus der Azadirachtin B-Fraktion der präp. HPLC isoliert. Die Reinigung erfolgte mit Dünnschichtchromatographie auf 0,5mm-SiO₂-Platten mit CHCl₃/Aceton (7:3) als Laufmittel (R_f 0,49).

HPLC: Laufmittel: Methanol/Wasser (2:3). Azadirachtin G hatte die 1,85-fache Retentionszeit des Azadirachtin A.

Ausbeute 3,1 mg, F.P. 141-143°C, $\lambda_{\max}$ 206 nm (ϵ = 15175 cm²/Mol).

II.2. Darstellung von Derivaten

Von Azadirachtin A und Azadirachtin B, den beiden in etwas größerer Menge isolierten Substanzen, wurden insgesamt neun Derivate erhalten. Dabei wurde in Übereinstimmung mit der Literatur festgestellt, daß die Azadirachtine chemisch sehr unbeständig sind⁶³. Die Ausbeuten waren wegen weitgehender Nebenreaktionen immer niedrig. Jede Reaktion wurde mit HPLC

verfolgt. Dabei wurde festgestellt, daß neben jeweils einem Hauptumsetzungsprodukt viele andere Substanzen entstanden, die entweder aus Nebenreaktionen stammten oder aber Zersetzungsprodukte darstellten. Ein Versuch mit Azadirachtin A zur Prüfung auf pH-Stabilität ergab, daß die Substanz in wässrigem Milieu zwischen pH 4 und pH 10 eine halbe Stunde lang stabil ist. Eine Stunde lang ist Azadirachtin A nur noch zwischen pH 5 und pH 9 stabil. Nach zwei Stunden war es nur noch nach Stehen im Bereich von pH 6 bis pH 8 nachweisbar.

2.1. Derivate von Azadirachtin A

2.1.1. 22,23-Dihydroazadirachtin A

Dieses Derivat wurde nach einer Vorschrift von Butterworth et al. hergestellt⁶⁴.

40,8 mg Azadirachtin A ($5,67 \times 10^{-5}$ Mol) wurden in 4 ml Essigester gelöst. Dazu wurden 20 mg $\text{PtO}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ gegeben. Die Mischung wurde gerührt und dabei 75 Min. lang H_2 durchgeleitet. Der Verlauf der Reaktion wurde mit HPLC überwacht. Nach Verschwinden des Azadirachtins A wurde die Reaktion unterbrochen und die Reaktionsmischung zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde eingengt und auf 0,5 mm SiO_2 -DC-Platten gereinigt. Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ (7:3), R_f 0,33.

Ausbeute: 28,2 mg (69% d.Th.), F.P. 164 - 167 °C,

$\lambda_{\text{max}} = 216,5 \text{ nm}$ ($\epsilon = 10541 \text{ cm}^2/\text{Mol}$)

2.1.2. 11-Acetylazadirachtin A

Die Darstellung dieses Derivats wurde nach einer Vorschrift von Butterworth et al.⁶⁴ durchgeführt.

109,4 mg Azadirachtin A ($1,5 \times 10^{-4}$ Mol) wurden mit 10 ml Essigsäureanhydrid unter Rückfluß gehalten. Es wurde so lang erhitzt, bis mit HPLC kein Azadirachtin A mehr nachzuweisen war. Dann wurde das überschüssige Essigsäureanhydrid bei einem Druck von 15 Torr abdestilliert. Der Rückstand wurde in 2 ml CHCl_3 gelöst und auf 0,5 mm- SiO_2 -DC-Platten gereinigt. Laufmittel: Ether/Aceton (9:1), R_f 0,14.

Ausbeute: 6,7 mg (6,1 %). F.P. 157-160°C, $\lambda_{\max}$ 206,5nm
(ϵ = 7810 cm²/Mol)

2.1.3. 3-Deacetylazadirachtin A

15,8 mg Azadirachtin A ($2,2 \times 10^{-5}$ Mol) wurden in 100 μ l Methanol gelöst. Zu dieser Lösung wurden dreimal jeweils 100 μ l einer methanolischen Natriummethylat-Lösung gegeben (0,6 g Natrium in 50 ml Methanol). Nach jeder Zugabe von 100 μ l Methylat-Lösung wurde 2 Minuten gewartet, dann mit HPLC überprüft, ob noch Azadirachtin A vorhanden war. Nach dem Verschwinden von Azadirachtin A wurde mit Essigsäure neutralisiert, mit H₂O verdünnt und mit CHCl₃ extrahiert. Die Abtrennung von den Nebenprodukten erfolgte mit der halbpräp. HPLC auf einer 20cm-RP-18-Säule mit 9 mm Innendurchmesser. Laufmittel: Methanol/Wasser (2:3), Detektion bei 215 nm, Ausbeute: 2,4 mg (15,2%).
F.P. > 250°C, $\lambda_{\max}$ 214,5 (ϵ = 22646 cm²/Mol)

2.1.4. 23 α -Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A und 23 β -Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A

30 mg Azadirachtin A ($4,2 \times 10^{-5}$ Mol) wurden in 0,5 ml CHCl₃ gelöst. Zu dieser Mischung wurden 120 μ l Acetylierungslösung (50 μ l Acetylchlorid in 2 ml CHCl₃) gegeben. Nach 10 Minuten wurde nicht umgesetztes Acetylchlorid mit Wasser zerstört. Der Ansatz wurde mit NaHCO₃-Lösung neutralisiert, dann mit CHCl₃ extrahiert. Die abschließende Reinigung erfolgte mit DC auf 0,5 mm-SiO₂-Platten.

Laufmittel: CHCl₃/Aceton (7:3)

Es gab zwei Hauptkomponenten:

- | | |
|---|-----------------|
| 1. R _f 0,54: 23 α -Ethoxy-Derivat | Ausbeute 5,2 mg |
| 2. R _f 0,24: 23 β -Ethoxy-Derivat | Ausbeute 2,4 mg |

Beim Ansatz mit Benzoylchlorid anstelle von Acetylchlorid entstand nur das 23 α -Ethoxy-Derivat. Der Umsatz war erst nach Stehen über Nacht vollständig.

F.P.: α -Derivat 152-154 °C, β -Derivat 147-150°C

UV: α -Derivat $\lambda_{\max}$ 204 nm (ϵ = 5964 cm²/Mol)

β -Derivat $\lambda_{\max}$ 221,5 nm (ϵ = 3010 cm²/Mol)

2.2. Derivate von Azadirachtin B

2.2.1. 22,23-Dihydroazadirachtin B

Das Derivat wurde analog der Vorschrift von Butterworth et al.⁶⁴ für das 22,23-Dihydroazadirachtin A hergestellt.

95 mg Azadirachtin B ($1,44 \times 10^{-4}$ Mol) wurden in 7 ml Essigester gelöst. Dazu wurden 45 mg $\text{PtO}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ gegeben, gerührt und zwei Stunden lang H_2 durchgeleitet. Danach wurde die Mischung filtriert und zentrifugiert. Der Überstand wurde eingeeengt und mit DC gereinigt.

Laufmittel: Ether/Aceton (4:1), R_f 0,37.

Ausbeute: 65 mg (68% d.Th.)

2.2.2. 3-(2-Methyl-butyryl)-3-detigloyl-22,23-dihydroazadirachtin B

Um dieses Derivat zu erhalten, wurde die Vorschrift von Butterworth et al.⁶⁴ für 22,23-Dihydroazadirachtin A abgeändert.

Azadirachtin B wurde im Verhältnis 1:2 zum Hydrierungskatalysator $\text{PtO}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ eingesetzt. Die Reaktionsdauer war mit drei Stunden im Vergleich zur Literatur deutlich verlängert. 7,1 mg Azadirachtin B ($1,07 \times 10^{-5}$ Mol) wurden in 1 ml Essigester gelöst und mit 15 mg $\text{PtO}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ versetzt. Die Mischung wurde gerührt und drei Stunden lang H_2 durchgeleitet. Das entstandene Platin wurde danach abfiltriert und der Überstand mit DC gereinigt.

Laufmittel: CHCl_3 /Aceton (7:3), R_f 0,35

Ausbeute 1,8 mg (25% d. Th.)

2.2.3. 3-Detigloylazadirachtin B

20 mg Azadirachtin B ($3,0 \times 10^{-5}$ Mol) wurden in 1 ml Methanol gelöst. Dazu wurden 5 ml 10%ige wässrige K_2CO_3 -Lösung gegeben. Nach 12 Stunden wurde mit Chloroform extrahiert. Die Chloroform-Phase wurde eingeeengt und mit DC gereinigt.

Laufmittel: CHCl_3 /Aceton (7:3), R_f 0,13.

Ausbeute: 5,2 mg (26% d. Th.). F.P. $145-146^\circ\text{C}$, λ_{max} 196 nm
($\epsilon = 10541 \text{ cm}^2/\text{Mol}$)

2.2.4. 23 α -Ethoxy-22,23-dihydro-13,14-de-epoxy-17-hydroxy azadirachtin B

22 mg Azadirachtin B ($3,3 \times 10^{-5}$ Mol) wurden mit $4,0 \times 10^{-5}$ Mol Acetylchlorid in 1 ml CHCl_3 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde mit 10%iger K_2CO_3 -Lösung und mit H_2O gewaschen. Die CHCl_3 -Phase wurde eingengt und mit DC gereinigt.

Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ (7:3), R_f 0,39.

Ausbeute: 4,4 mg (20% d.Th.). F.P. 170-174 °C, λ_{max} 216 nm
($\epsilon = 5901 \text{ cm}^2/\text{Mol}$)

3. Biologischer Test

Für die biologischen Untersuchungen wurde der Epilachna-Käfigtest verwendet⁶⁵. Zehn junge Bohnenpflanzen (mit insgesamt 20 Primärblättern) wurden mit 4 ml einer methanolischen Lösung definierter Konzentration der zu testenden Substanz eingesprüht. Zur Kontrolle wurden zehn Pflanzen in der gleichen Weise mit Methanol behandelt. Dann wurden 20 Larven des Mexikanischen Bohnenkäfers (Epilachna varivestis) im vierten Stadium gewogen, auf diese Bohnenpflanzen gesetzt, dort 48 Stunden lang belassen, erneut gewogen, auf frische, unbehandelte Pflanzen umgesetzt und die Entwicklung bis zum erwachsenen Käfer weiter verfolgt. Die Normalentwicklung vom Beginn des vierten Larvenstadiums (Testbeginn) bis zum erwachsenen Tier dauerte 8 Tage. Der Versuch wurde so oft wiederholt, bis bei der eingesetzten Konzentration des Azadirachtins nur noch die Hälfte der zu Versuchsbeginn eingesetzten Larven das Adultstadium erreichten. Diese als MC_{50} (Metamorphose-störende Konzentration bei 50% der eingesetzten Tiere) bezeichnete Konzentration wurde aus allen Versuchen, die mit einer Substanz durchgeführt wurden, rechnerisch bestimmt.

4. Benützte Geräte

1. Analytische HPLC

Pumpe: Philips Pye Unicam PU 4010

Detektor: Philips Pye Unicam PU 4020

Säulen: 100x5 mm oder 200x5 mm

Säulenmaterial: Shandon RP-18

bei 100mm-Säule: 3 μ -Material

bei 200mm-Säule: 5 μ -Material

Integrator: Spectra Physics SP 4100

Auftragssystem: Rheodyne Typ 7105

2. Präparative HPLC

Pumpe: Büchi Mitteldruckpumpe Typ 681

Detektor: Pye Unicam PU4020

mit präparativer Durchflußzelle

Fraktionssammler: Gilson Modell 201

3. Lösungsmittel für HPLC

Lösungsmittel mit dem Reinheitsgrad p.a. der

Firmen Riedel-de-Haën und Merck

Wasser wurde bidestilliert

4. Massenspektren

FAB-MS: Finnigan MAT-312 Spektrometer mit

Datensystem SS 200-MS

EI-MS: Varian CH 7A

5. NMR-Spektren

Protonenspektren: Bruker AM-500

homonuclear shift korrelierte 2D-Spektren (COSY)

wurden mit der Jeener Sequenz gemessen

90 - t_1 - 90 - FID (t_2)^{66,67}

dipolar relaxierte Spektren (NOESY) wurden

mit der folgenden Sequenz gemessen:

90 - t_1 - 90 - t_M - 90 - FID (t_2)^{68,69}

Kohlenstoffspektren: Bruker AM 400

die Spektren wurden nach der distortionless
enhancement by polarization transfer (DEPT)-
Methode gemessen ⁷⁰.

Lösungsmittel für NMR: CDCl_3 Merck Nr. 2446

6. Epilachna varivestis-Larven wurden der laufenden Zucht entnommen
7. Die statistische Auswertung der Biotests wurde auf einem Hewlett-Packard HP-86 Mikrocomputer durchgeführt.

III. Ergebnisse und Diskussion

III.1. Isolierung der Azadirachtine A-G aus Neemnüssen

57 kg Neemnüsse wurden geschält, gemahlen, zuerst mit Hexan und anschließend mit Aceton extrahiert. Die beiden Extrakte wurden mit dem Epilachna-Test (s.S.16) untersucht. Eine biologische Aktivität wurde nur in der Acetonfraktion festgestellt. In dieser Arbeit sollten nur Epilachna-aktive Substanzen isoliert werden, daher wurde nur der Aceton-Extrakt weiter gereinigt.

Eine schematische Darstellung der Aufarbeitung ist in Abbildung 3 auf Seite 20 gezeigt.

Bei der Chromatographie an einer Kieselgelsäule war die Aktivität in der Fraktion enthalten, die mit Essigester/Hexan (8:2) eluiert wurde. Diese Fraktion wurde dann in dem Zweiphasensystem Hexan/Methanol/Wasser (4:1:5) verteilt. Die biologische Aktivität war in der Methanolphase. Diese wurde anschließend auf einer RP-8-Säule chromatographiert. Die biologisch aktiven Fraktionen wurden gesammelt und mit präparativer HPLC aufgetrennt.

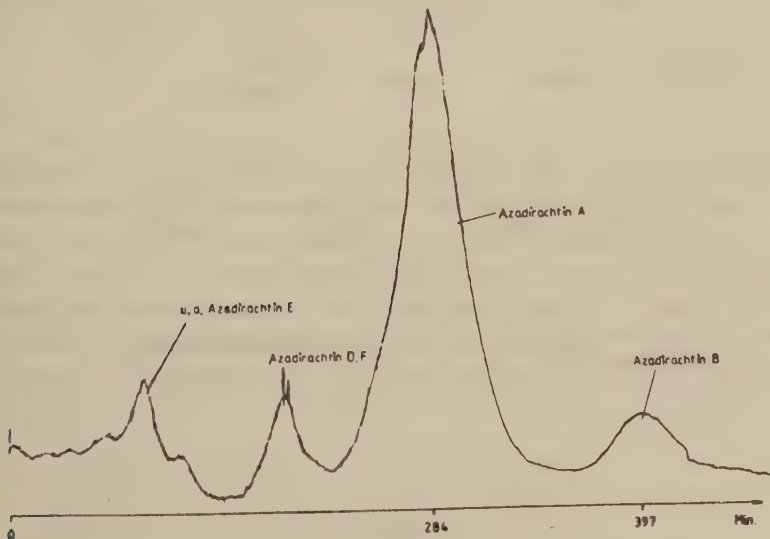


Abb.2. Präparative HPLC der Azadirachtine bei Chromatographie an RP-8. UV-Absorption bei 230 nm

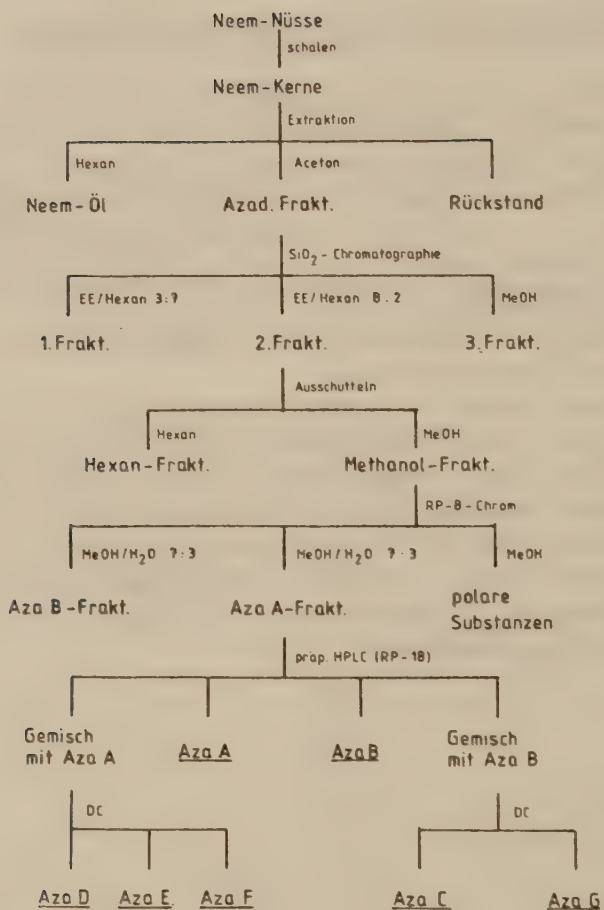


Abb.3. Schematische Darstellung der Aufarbeitung der Neemnüsse

Abbildung 2 zeigt die Trennung eines Neem-Extrakts mit der präparativen HPLC. Aus dieser Chromatographie wurden Azadirachtin A und Azadirachtin B als Reinstoffe isoliert. Die anderen Fraktionen der präp. HPLC, die Gemische aus verschiedenen Substanzen enthielten (z.B. Azadirachtin D und F), wurden mit Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

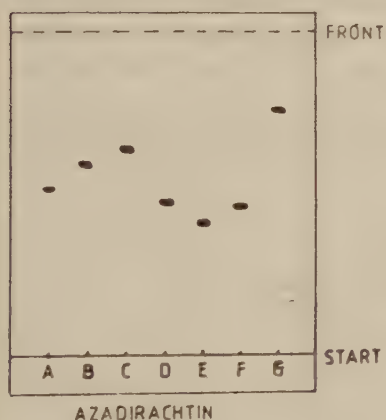


Abb.4. Dünnschichtchromatogramm der gereinigten Azadirachtine A - G. SiO_2 -HPTLC-Platte, Laufmittel: CHCl_3 /Aceton (1:1)

Abbildung 4 zeigt die Auftrennung der als Reinstoffe isolierten Azadirachtine auf einer SiO_2 -DC-Platte mit CHCl_3 /Aceton (1:1) als Laufmittel. Es zeigte sich, daß die Substanzen mit diesem Laufmittel gut getrennt werden können. Sehr ähnliche R_f -Werte haben nur Azadirachtin D und F. Zur Trennung dieser Substanzen mußte deshalb ein anderes Laufmittelgemisch benützt werden (z.B. Diethylether/Aceton 9:1).

Die Ausbeuten an reinen Azadirachtinen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Diese sind nicht charakteristisch für die Konzentration dieser Stoffe in der lebenden Pflanze, weil während der Reinigung (besonders bei der Dünnschichtchromatographie) erhebliche Ausbeuteverluste eintreten. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Ausbeuten an Azadirachtin A und Azadirachtin B mit denen der anderen Azadirachtine vergleicht. Bei den beiden zuerst genannten Verbindungen war ein Reinigungsschritt weniger als bei den Azadirachtinen C - G erforderlich. Die isolierten Mengen an Azadirachtin A und Azadirachtin B sind deshalb erheblich höher.

Tabelle 1: Mengen der als Reinstoffe isolierten
Azadirachtine

Azadirachtin A	3500	mg
Azadirachtin B	700	mg
Azadirachtin C	4,7	mg
Azadirachtin D	3,8	mg
Azadirachtin E	9,4	mg
Azadirachtin F	4,5	mg
Azadirachtin G	3,1	mg

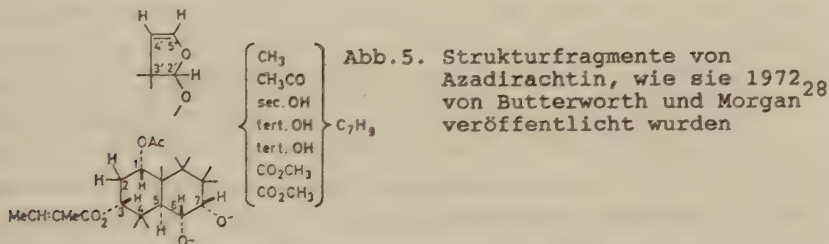
Wie auch ein Vergleich der Peakflächen in Abbildung 2 zeigt, sind in der Pflanze die Konzentrationsunterschiede nicht so groß. In Abbildung 2 bilden Azadirachtin D und F zusammen eine etwa halb so große Bande wie Azadirachtin B. Dennoch konnten von diesen beiden Verbindungen zusammen nur 8,3 mg isoliert werden, von Azadirachtin B jedoch rund 700 mg.

III.2. Strukturaufklärungen

Die mit Hilfe des Epilachna-Tests (s.S.16) aus Neemsamen isolierten sieben Substanzen zeigen alle eine wachstumshemmende Wirkung. Die Hauptkomponente der isolierten Substanzen ist Azadirachtin A.

2.1. Struktur von Azadirachtin A

Butterworth und Morgan²⁸ hatten 1968 unter Verwendung eines Fraßtests Azadirachtin aus Kernen des Neembbaums (Azadirachta indica) isoliert. 1972 veröffentlichten diese Autoren eine Teilstruktur⁶⁴. Es wurden das Molekulargewicht, die Summenformel $C_{35}H_{44}O_{16}$ und einige funktionelle Gruppen angegeben (Abb.5):



Durch Anwendung neuer ^{13}C -NMR-Methoden (PRFT und CWD) kamen Zanno et al.⁶⁰ und Nakanishi⁶³ zu einem Vorschlag für die Gesamtstruktur von Azadirachtin (Abb.6).

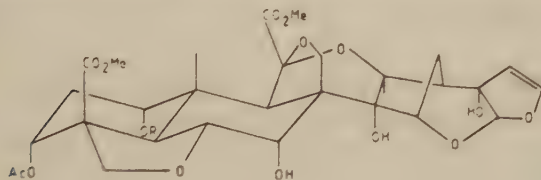
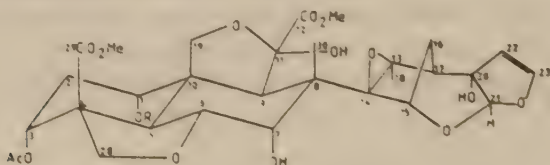


Abb.6. Struktur von Azadirachtin nach Zanno et al.⁶⁰

R = Tigloyl

1985, also 10 Jahre nach dem ersten vollständigen

Strukturvorschlag kamen Bilton et al.⁷¹ zu einer neuen Struktur. Sie ist in drei Punkten gegenüber der in Abbildung 6 gezeigten verschieden. Die Sauerstoffbrücken gehen von C-11 nach C-19 und C-14. An C-13 steht eine Hydroxylgruppe. Gleichzeitig veröffentlichten Kraus et al.⁶¹ einen anderen Strukturvorschlag (Abb. 7). Demnach steht an C-11 eine Hydroxylgruppe und an C-13/C-14 eine Epoxid-Funktion. 1986 gelang es der Arbeitsgruppe um Ley⁶², das Detigloyldihydroderivat des Azadirachtins zu kristallisieren. Die Röntgenstrukturanalyse bestätigte dann den Strukturvorschlag von Kraus⁶¹.



R = Tigloyl

Abb. 7. Struktur von Azadirachtin nach dem Vorschlag von Kraus et al.⁶¹. Dieser Strukturvorschlag wird durch die Röntgenstrukturanalyse des Detigloyldihydroderivats gestützt (Broughton et al.⁶²).

Bei Beginn der vorliegenden Arbeit im Jahr 1983 lag noch der Strukturvorschlag von Zanno et al.⁶⁰ vor. Im Verlauf unserer Untersuchungen fanden wir, daß die NMR-Daten nicht zufriedenstellend zu diesem Vorschlag paßten. An einer Nebenkompente, heute Azadirachtin B genannt, entwickelten wir die jetzt gültige Struktur⁷². Kurz vor Erscheinen der zitierten Arbeit wurde von Klenk et al.⁷³ die Struktur von Azadirachtin B veröffentlicht.

Durch Vergleich der NMR-Spektren konnte bestätigt werden, daß Azadirachtin^{61,62} mit Azadirachtin A identisch ist.

Die Strukturaufklärung der fünf nachstehend beschriebenen, bisher unbekannten Substanzen beruht hauptsächlich auf der Auswertung von NMR-Spektren. Vor allem wurden diese Spektren mit denen der mittlerweile bekannten Verbindungen Azadirachtin A und Azadirachtin B verglichen.

Das NMR-Spektrum von Azadirachtin A zeigt einige charakteristische Protonengruppierungen. Im folgenden sollen diese kurz dargestellt werden, da sie als Charakterisierungshilfe für die anderen hier isolierten Azadirachtine dienen.

2.2. Charakterisierung der Azadirachtine durch verschiedene Mehrspinsysteme

a) Vierspinsystem H-1/H-2/H-3

Die Protonen H-1 und H-3 sind an C-Atome gebunden, die eine Sauerstofffunktion tragen. Sie kommen dadurch in den Bereich von 3,5 - 5,5 ppm. Die beiden Protonen an C-2 liegen im Bereich von 1,8 - 2,4 ppm. Die geminale Kopplungskonstante ist 17,0 Hz. Beim Azadirachtin A hat H-1 eine Verschiebung von 4,77 ppm und ist durch die Kopplungen zu C-2 zu einem Triplet mit einer Kopplungskonstante von 2,7 Hz aufgespalten. Auch H-3 ist ein Triplet mit 2,7 Hz, liegt jedoch bei 5,51 ppm. Dieses Spinsystem fällt besonders im COSY auf, wo es sowohl an der großen geminalen Kopplung, als auch an der gleichartigen Kopplung von H-2 zu H-1 und H-3 erkannt werden kann (s. Anhang Abb. A1 und A2, sowie Tab. A1).

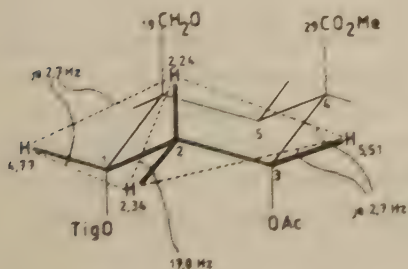


Abb.8. Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten des Vierspinsystems C-1/C-2/C-3

b) Dreispinsystem H-5/H-6/H-7

H-5 hat eine chemische Verschiebung von 3,35 ppm und ist durch die Kopplung zu H-6 zu einem scharfen Dublett mit 12,7 Hz Kopplungskonstante aufgespalten. Die Größe der Kopplung ist ein Hinweis darauf, daß der vicinale Winkel zwischen diesen beiden Protonen etwa 180° betragen muß. H-6 liegt bei 4,61 ppm und ist durch seine zusätzliche Kopplung zu H-7 zu einem Doppeldublett aufgespalten. Die Größe der Kopplung zu H-7 beträgt 2,6 Hz. H-7 liegt bei 4,75 ppm. Das Signal erscheint als breites Singulett, da C-7 eine OH-Gruppe trägt. Das Proton kann im COSY aufgrund der Kopplung zu H-6 eindeutig zugeordnet werden.

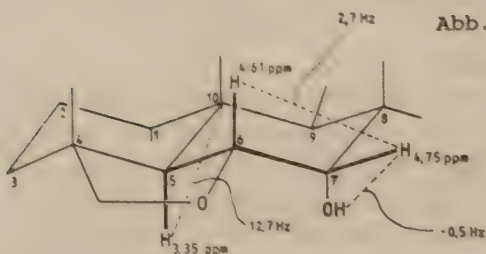


Abb. 9. Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten des Dreispinsystems C-5/C-6/C-7

c) Vierspinsystem H-15/H-16/H-17

Die Protonen H-16 und H-17 liegen im aliphatischen Bereich des Spektrums bei 1,3 - 2,4 ppm. H-15 ist mit einem C-Atom verbunden, das eine Sauerstofffunktion trägt und liegt daher im tieferen Feld bei 4,67 ppm. H-15, H-16b (1,32 ppm) und H-17 (2,38 ppm) sind nur zu Dubletts aufgespalten, obwohl sie mehrere Kopplungspartner haben. Das spricht dafür, daß dieses System nicht symmetrisch ist, sondern daß eine kleine H-Brückenbindung zwischen dem Epoxid-Sauerstoff und H-16a besteht, die das ganze System etwas verzerrt und dadurch den Kopplungswinkel zwischen H15/H16a bzw. H17/H16a ungünstig beeinflusst. H-17 koppelt mit H-16a ($J=5,3$ Hz); H-16b hat nur eine geminale Kopplung zu H-16a ($J=13,1$ Hz). H-15 koppelt

mit H-16a, die Kopplungskonstante beträgt 3,4 Hz. H-16a wird insgesamt zu einem Tripel-Dublett aufgespalten. Damit erscheinen im Protonenspektrum acht Linien, die nur noch eine geringe Intensität haben und außerdem oft unter den Signalen von Methylgruppen verborgen sind. Im COSY ist das Vorhandensein dieses Protons jedoch leicht an seinen drei Kopplungen zu beweisen.

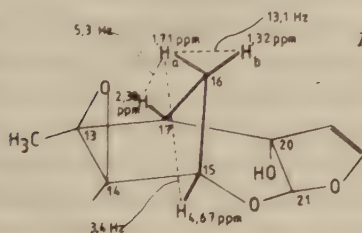


Abb.10. Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten des Vierspin-systems C-15/C-16/C-17

d) Protonen am Dihydrofuranring

Die drei Protonen sind charakteristisch und leicht zu identifizieren. Sie liegen in einem Bereich des Spektrums, in dem die Resonanzen von nur wenigen anderen Protonen liegen. H-22 und H-23 koppeln mit einer Kopplungskonstanten von 2,7 Hz. H-22 hat eine chemische Verschiebung von 5,05 ppm, H-23 von 6,46 ppm. Das scharfe Singulett von H-21 liegt bei 5,65 ppm. Der Dihydrofuran-Ring steht im Molekül frei nach außen, er wird nicht von anderen funktionellen Gruppen beeinträchtigt. Dadurch sind die NMR-Resonanzen in allen Azadirachtinen, die diesen Ring enthalten, fast identisch.

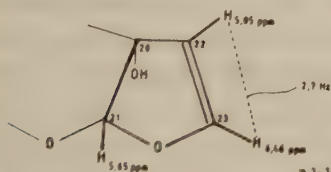


Abb.11. Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten der Protonen am Dihydrofuranteil

Azadirachtin A hat zwei Fünfring-Ether, die an das Dekalin-System der Ringe A und B angegliedert sind. Beim ersten dieser Ringe sind außer C-19 noch C-9, C-10 und C-11 beteiligt, beim zweiten handelt es sich außer um C-28 noch um C-4, C-5, C-6. Die jeweils zwei Protonen an C-19 und C-28 sind zu Dubletts aufgespalten, da das C-Atom, an das sie gebunden sind, mit Sauerstoff auf der einen und mit einem quartären C-Atom auf der anderen Seite verbunden ist. Daher ist kein Proton in der Nähe, das zu einer zusätzlichen Kopplung und damit zur Ausbildung eines komplizierteren Musters in der Lage wäre. Die vier Protonen erscheinen als vier scharfe Dubletts im Bereich von 3,4 - 4,2 ppm.

Es fällt auf, daß die Methylenbrücke an C-19 trotz beinahe gleicher chemischer Umgebung eine größere Kopplungskonstante aufweist als die Methylengruppe an C-28. Die Kopplungskonstante von H-19 beträgt 9,7 Hz, die von H-28 nur 9,0 Hz.

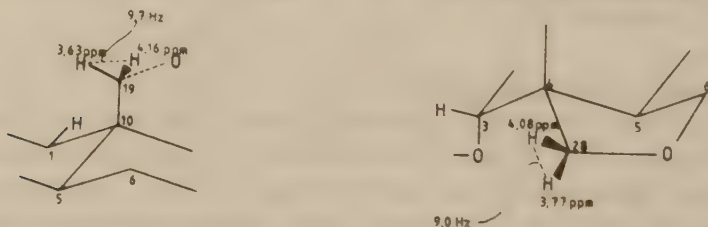
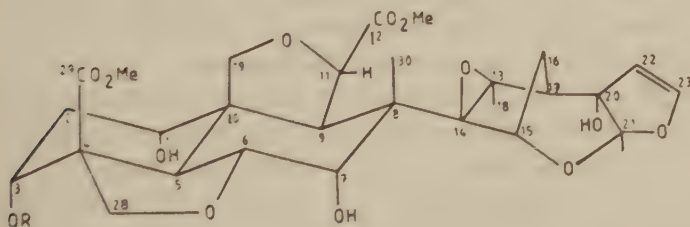


Abb.12. Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten der Protonen an den Methylenbrücken von C-28 (links) und C-19 (rechts)

Die übrigen Protonen im Spektrum von Azadirachtin A sind keinem bestimmten Strukturtyp zuzuordnen. Zum Grundgerüst gehören die Protonen an C-9, C-18 und C-30. H-9 ist ein scharfes Singulett bei 3,34 ppm. H-18 und H-30 sind Methylgruppen bei 2,01 und 1,75 ppm. Die übrigen Resonanzen gehören zu den Substituenten am Grundgerüst, Tiglin- und Essigsäureester und die Methylester an C-29 und C-12.

2.3. Struktur von Azadirachtin B

Die zweite Hauptkomponente der hier isolierten Substanzen, Azadirachtin B, wurde 1983 im Rahmen dieser Arbeit erstmals isoliert⁷⁴ und dafür eine Teilstruktur angegeben. Später wurden in der Literatur zwei Substanzen unter einem anderem Namen beschrieben, welche die gleichen spektroskopischen Eigenschaften wie Azadirachtin B aufweisen^{73,75,76}. Kubo et al.^{75,76} lehnen sich beim Strukturvorschlag für den von ihnen als Azadirachtinol bezeichneten Naturstoff an die von Nakanishi⁶³ und Zanno et al.⁶⁰ für Azadirachtin A vorgeschlagene Strukturformel an, die sich später als falsch erwies. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur von Azadirachtin B aufgeklärt⁷². Parallel dazu haben Klenk et al.⁷³ die gleiche Struktur für die von ihnen als Azadirachtol bezeichnete Neemsubstanz publiziert. Das Molekulargewicht von Azadirachtin B, gemessen mit FAB-Neg.-MS, beträgt 662 Masseneinheiten. Dies ist in Übereinstimmung mit Klenk et al.⁷³, jedoch im Gegensatz zu Kubo et al.^{75,76}, die ein Molekulargewicht von 680 nannten.



R = Tigloyl

Abb.13. Struktur von Azadirachtin B

Das Protonen-NMR-Spektrum von Azadirachtin B ähnelt dem von Azadirachtin A. Es fehlt jedoch die Methylgruppe des Acetats bei 1,95 ppm. Desgleichen fehlt die Resonanz der Hydroxylgruppe bei 5,03 ppm. Statt dessen ist im COSY eine kleine Wechselwirkung von H-9 mit dem Signal bei 4,45 ppm zu erkennen, das die Resonanz von H-11 ist. An C-1 sitzt eine OH-Gruppe, wie durch D₂O-Austausch bewiesen werden konnte.

Die zu Azadirachtin A unterschiedliche Lage der Tiglinsäure an C-3 wurde durch Vergleich des Protonenspektrums mit dem von Detigloylazadirachtin B bewiesen ⁷². Dabei ergibt sich nach der Verseifung der Tiglinsäure eine Verschiebung der Protonen unter anderem an C-28. Diese Verschiebung ist nur möglich, wenn die Tiglinsäure vorher an C-3 gebunden war. Die NMR-Spektren sind im Anhang als Abb.A3 und A4 gezeigt.

Tabelle 2. Protonenresonanzen im NMR-Spektrum von Azadirachtin B

Proton	¹ H-Res. M, J (ppm) (Hz)	Proton	¹ H-Res. M, J (ppm) (Hz)
1	3,49 (t;2,5)	21	5,64 (s)
2a	2,29 (dt;16,2;2,5)	22	5,01 (d;2,9)
2b	2,05 verdeckt	23	6,41 (d;2,9)
3	5,51 (t;2,5)	28a	3,81 (d;9,0)
5	3,30 (d;12,6)	28b	4,01 (d;9,0)
6	4,52 (dd;12,6;2,7)	30	1,42 (s)
7	4,70 (d;2,7)	OMe	3,74 (s)
9	3,17 (d;<1)	OMe	3,74 (s)
11	4,45 (d;<1)	Tigloyl:	
15	4,56 (d;2,8)	3'	6,92 (q;7,0)
16a	1,63 (ddd;13,1;5,2;2,8)	4'	1,77 (d;7,0)
16b	1,31 (d;13,1)	5'	1,82 (s)
17	2,34 (d;5,2)		
18	2,02 (s)	OH:	
19a	3,47 (d;9,4)	3,41; 2,8; 3,2	
19b	3,92 (d;9,4)		

2.4. Struktur von Azadirachtin C

Von Azadirachtin C konnte nur die in Abb.14 gezeigte Teilstruktur ermittelt werden.

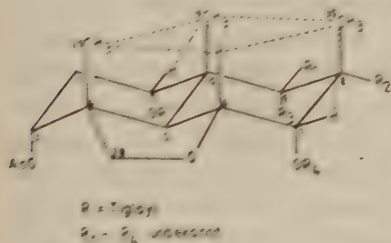


Abb.14. Strukturfragment von Azadirachtin C. Die gestrichelten Linien zeigen NOE-Wechselwirkungen.

Das eindimensionale ^1H -NMR-Spektrum zeigt keines der typischen Azadirachtinmuster, außer den Resonanzen der Tiglinsäure bei 6,90, 1,79 und 1,83 ppm. Im COSY sind die Muster von H-1/H-2/H-3 sowie von H-5/H-6/H-7 zu erkennen. Das Signal von H-7 ist zu hohem Feld verschoben (Azadirachtin A: 4,74 ppm; Azadirachtin B: 4,70 ppm; Azadirachtin C: 4,19 ppm), und es erscheint als scharfes Dublett. Folglich steht an C-7 keine freie Hydroxylgruppe, wohl aber ist dort eine andere Sauerstofffunktion gebunden. Die Protonen der Methylenbrücke von C-28 liegen bei 3,65 und 3,54 ppm. Das Proton bei 3,54 ppm hat eine kleine Kopplung zu der Methylgruppe bei 1,14 ppm. In dem Molekül ist kein Methylester zu erkennen. Die Methylgruppe bei 1,14 ppm ist daher identisch mit C-29. Diese Annahme wird durch das NOE-Spektrum gestützt, in dem diese Methylgruppe zwei Wechselwirkungen zeigt: zum einen mit dem Proton bei 3,9 ppm, das als H-6 identifiziert wurde, zum anderen mit der Methylgruppe bei 0,87 ppm. Dieser Resonanz liegt die angulare Methylgruppe C-19 zugrunde, die ihrerseits NOE-Wechselwirkungen mit den Methylgruppen C-29 (1,14 ppm) und C-30 (1,23 ppm) sowie mit den Protonen H-1 (4,82 ppm) und H-6 (3,9 ppm) hat. Die letzte der Methylgruppen an den Ringen A und B ist die Gruppe von C-30. Sie kann durch ihre

NMR zu H-6 und H-7 identifiziert werden. Durch diese Wechselwirkungen steht das Gerüst des Ringsystems A und B fest. Die beiden Protonen von C-1 und C-3 liegen bei sehr tiefem Feld (4,81 ppm und 4,91 ppm). Das bedeutet, daß beide OH-Gruppen an diesen C-Atomen verestert sind. Diese beiden Resonanzen sind mit denen der Protonen an C-1 und C-3 im Asadirachtin D vergleichbar. Die Methylgruppe des Acetats erscheint im NMR-Spektrum bei 1,24 ppm. Im Spektrum sind noch zwei weitere Methylgruppen zu erkennen. Eine liegt bei 1,17 ppm, die andere bei 2,31 ppm. Beide gehören zum rechten Teil des Moleküls. Mit D_2O verschwindet das Dublett bei 5,21 ppm, das Dublett bei 5,90 ppm erscheint dann als Singulett. Im Spektrum sind weitere 17 Protonen zu sehen, die aber nicht zugeordnet werden konnten. Für die weitere Strukturermittlung ist die Messung von ^{13}C -Spektren wichtig. Dies war in der vorliegenden Arbeit wegen zu geringer Substanzmenge nicht möglich. Die Abbildung des 1H -NMR-Spektrums befindet sich im Anhang (Abb. A5).

Tabelle 2. Versuche, die aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von
 2,2,6,6-Tetramethyl-3-piperidinol abgelesen werden konnten.

Proton	δ -Wert (ppm)	X	J (Hz)	MR zu Proton an C-
1	4,82	t	2,7	19
2a	2,17	d,t	16,6/2,7	
2b	2,04	d,t	16,6/2,7	
3	4,91	t	2,7	29
5	2,65	d	12,6	
6	3,90	d,d	12,6/3,5	30,29,19
7	4,19	d	3,5	30
19	0,27	s		1,29,30,6
28a	3,65	d	7,9	
28b	3,54	d,d	7,9/4,1	
29	2,14	s		
30	1,23	s		6,7, 1,78 ppm
30a	1,34	s		
Tigloyl:				
1'	6,90	s	7,1	
4'	1,79	s	7,1	
5'	1,83	s		

X = Multiplizität

J = Kopplungskonstante

2.5. Struktur von Azadirachtin D

Azadirachtin D unterscheidet sich von Azadirachtin A durch eine andere Substitution an C-4. Der Methylester an C-4 ist zu einer Methylgruppe reduziert.

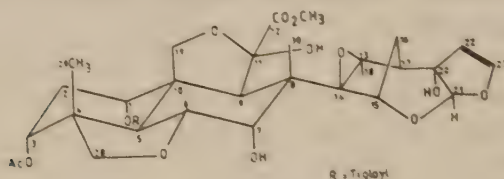


Abb.15. Struktur von Azadirachtin D

Die Protonen von C-22 und C-23, sowie von C-15/C-16/C-17 haben im COSY das gleiche Muster und sind auch in ihrer chemischen Verschiebung mit dem Azadirachtin A identisch. Der rechte Teil des Moleküls unterscheidet sich somit nicht von Azadirachtin A. Unterschiedliche chemische Verschiebungen treten bei den Protonen an C-1/C-2/C-3/C-5/C-6 und C-28 auf.

Tabelle 4. Differenzen in den Protonenresonanzen von Azadirachtin D und Azadirachtin A (A-D)

H-Atom	A - D (ppm)
1	0,10
2a	0,13
2b	0,12
3	0,58
5	0,25
6	0,44
28a	0,10
28b	0,39

Alle diese Resonanzen sind im Azadirachtin D zu hohem Feld verschoben. Das bedeutet, daß eine polare, entschirmende Gruppe weggefallen ist. Im ^1H -NMR-Spektrum ist nur noch ein Methylester bei 3,70 ppm vorhanden. Die neu hinzugekommene aliphatische Methylgruppe erscheint bei 1,06 ppm. Im COSY beobachtet man eine Kopplung zu H-28a (3,63 ppm). Mit FAB-MS wurde ein Molekulargewicht von 776 festgestellt. Der Unterschied zum Azadirachtin A beträgt 44 Masseneinheiten. Dies entspricht dem geforderten Verlust von formal CO_2 . Im Anhang ist in Abb. A6 das ^1H -NMR-Spektrum von Azadirachtin D gezeigt. F.P. 148-153 °C, λ_{max} 210,0 nm (s.S. 11)

Tabelle 5. Zuordnung der Resonanzsignale aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Azadirachtin D

Proton	^1H -Res. (ppm)	M, J (Hz)	Proton	^1H -Res. (ppm)	M, J (Hz)
1	4,69	t,2,5	22	5,05	d,2,9
2a	2,23	dt,16,5;2,5	23	6,45	d,2,9
2b	2,10	verdeckt	28a	3,63	d,8,1
3	4,92	t,2,5	28b	3,59	d,8,1
5	3,09	d,12,6	29	1,06	s
6	4,17	dd,12,6;2,7	30	1,74	s
7	4,73	s _{br}	OMe	3,70	s
9	3,34	s	OAc	1,93	s
15	4,67	d,3,5	Tigloyl:		
16a	1,70	ddd,14,2;3,5;5,2	3'	6,88	q,6,9
16b	1,30	d,14,2	4'	1,78	d,6,9
17	2,40	d,5,2	5'	1,85	s
18	2,07	s	OH(11)	5,04	
19a	4,21	d,9,4	OH	2,73	
19b	3,82	d,9,4	OH	3,19	
21	5,68	s			

2.6. Struktur von Azadirachtin E

Azadirachtin E ist das in der Pflanze vorkommende Detigloylderivat von Azadirachtin A.

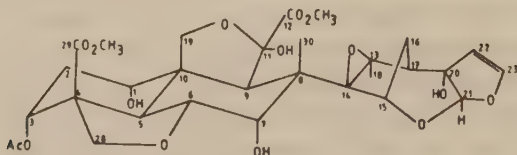


Abb.16. Struktur von Azadirachtin E

Im NMR-Spektrum fehlen die Resonanzsignale der Tiglinsäure. Verglichen mit dem Spektrum von Azadirachtin A sind nur die Protonen von C-1 und C-5 deutlich verschoben. Die Verschiebung von H-5 mit 0,15 ppm zu hohem Feld ist auf einen Anisotropie-Effekt der Tiglinsäure zurückzuführen. Eine ähnliche Verschiebung von H-5 ist auch bei 3-Detigloyl-azadirachtin B festzustellen. Die Verschiebung von H-1 ist mit 0,22 ppm zu gering, wenn an diesem C-Atom die Tiglinsäure abhydrolysiert wurde. Die Verschiebung beträgt nach dieser Verseifung 0,5 - 1,0 ppm. Die Acetylgruppe an C-3 hat jetzt eine größere Bewegungsfreiheit. Dadurch kommt ein stärkerer Anisotropie-Effekt dieser Gruppe zur Wirkung, der der Verschiebung durch die Hydrolyse entgegenwirkt. Die Verschiebungen in diesem Molekül gegenüber Azadirachtin A sind ein Beweis für die Stellung der Tiglinsäure an C-1. Wenn sie an C-3 gebunden wäre, müßten die Protonen an C-28 verschoben sein. Das ist jedoch nicht der Fall. Die übrigen Resonanzen sind identisch mit denen von Azadirachtin A. Im Anhang ist in Abb. A7 das ^1H -NMR-Spektrum von Azadirachtin E dargestellt. MG 640, F.P. 166-168°C, λ_{max} 209,2 nm (s.S. 11)

Tabelle 6. Zuordnung der Resonanzsignale aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Azadirachtin E

Proton	^1H -Res. (ppm)	M, J (Hz)	Proton	^1H -Res. (ppm)	M, J (Hz)
1	4,54	t, 2,5	19b	4,14	d, 9,7
2a	2,39	dt, 17; 2,5	21	5,68	s
2b	2,20	dt, 17; 2,5	22	5,06	d, 2,9
3	5,49	t, 2,5	23	6,46	d, 2,9
5	3,20	d, 12,6	28a	3,73	d, 8,9
6	4,58	dd, 12,6; 2,7	28b	4,07	d, 8,9
7	4,75	d, 2,7	30	1,75	s
9	3,37	s	OMe	3,71	s
15	4,66	d, 3,5	OMe	3,79	s
16a	1,73	ddd, 11,8; 3,5; 5,2	OAc	2,02	s
16b	1,33	d, 11,8	OH:		
17	2,44	d, 5,2		2,66; 3,03;	
18	2,07	s		4,97; 2,30;	
19a	3,59	d, 9,7			

2.7. Struktur von Azadirachtin F

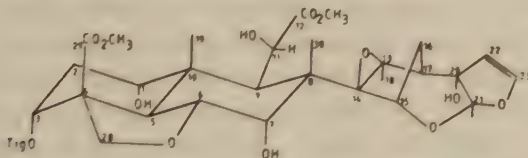


Abb.17. Struktur von Azadirachtin F

Diese Substanz ist eine reduzierte Form von Azadirachtin B. Die Methylenbrücke an C-19 ist geöffnet und zur Methylgruppe reduziert. An C-11 stehen eine Hydroxylgruppe und ein

Tabelle 7. Zuordnung der Resonanzen aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Azadirachtin F

Proton	^1H -Res. (ppm)	M, J (Hz)	Proton	^1H -Res. (ppm)	M, J (Hz)
1	5,33	t, 2,8	19	1,84	s
2a	2,38	dt, 16,8; 2,8	21	5,62	s
2b	2,29	dt, 16,8; 2,8	22	5,01	d, 2,9
3	5,49	t, 2,8	23	6,42	d, 2,9
5	3,33	d, 12,5	29a	3,71	d, 8,8
6	4,43	dd, 12,5; 2,7	29b	4,06	d, 8,8
7	4,62	d, 2,7	30	1,29	s
9	2,61	s	OMe	3,76	s
11	5,37	s	OMe	3,76	s
15	4,55	d, 3,8	Tigloyl:		
16a	1,66	ddd, 13,1; 5,3; 3,8	3'	8,94	qd, 7,1; 1,5
16b	1,25	d, 13,1	4'	1,74	d, 7,1
17	2,32	d, 5,3	5'	1,63	d, 1,5
18	1,95	s	OH: 3,09; 2,9; 2,67		

Proton. Das NMR-Spektrum ähnelt den Spektren von Azadirachtin A und B. Der rechte Teil dieser Moleküle ist im Azadirachtin F unverändert erhalten. Das Proton an C-11 erscheint bei 5,37 ppm als breites Singulett und zeigt in COSY eine Kopplung zu dem Hydroxylsignal bei 3,09 ppm. Es ist nur eine Methylenbrücke zu erkennen, deren Protonensignale bei 4,06 und 3,71 ppm liegen. Die geminale Kopplungskonstante beträgt 8,8 ppm. Die Größe der Kopplung ist typisch für Protonen an C-18. Die Resonanzen der Methylenbrücke an C-19 sind nicht vorhanden. Von fünf aliphatischen Methylgruppen gehören zwei zur Tiglinsäure, eine zu C-18, eine zu C-30. Die fünfte Methylgruppe ist C-18, ihr Signal liegt bei 1,84 ppm. Bei den beiden Protonen an C-9 (2,61 ppm) und C-11 (5,37 ppm) ist keine Kopplung festzustellen. Der vicinale Winkel zwischen diesen Protonen

muß daher etwa 90° betragen. Die NMR-Spektren von Azadirachtin F sind im Anhang als Abb. A8 und A9 dargestellt. MG, bestimmt mit FAB-MS: 664; F.P. $148-151^\circ\text{C}$, λ_{max} 208 nm. (s.S. 12).

2.8. Struktur von Azadirachtin G

Azadirachtin G ist ein Isomeres von Azadirachtin B mit dem Molekulargewicht 662, bestimmt mit FAB-MS.

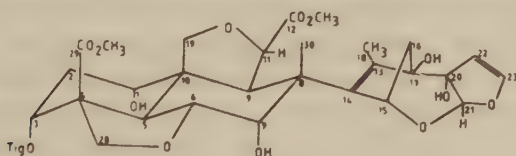


Abb.18. Struktur von Azadirachtin G

Das Dekalinsystem mit seinen Substituenten hat die gleiche Struktur wie Azadirachtin B. Im Bereich von C-13 bis C-23 ist der Epoxidring nicht vorhanden. An seiner Stelle ist eine C-C-Doppelbindung. Das Proton an C-17 fehlt ebenfalls, an seiner Stelle steht eine OH-Gruppe. Der Dihydrofuranring ist genau wie bei allen anderen aus der Pflanze isolierten Azadirachtinen erhalten. Im rechten Teil des Moleküls gibt es große Unterschiede in der Zuordnung der einzelnen Protonen, verglichen mit denen im NMR-Spektrum von Azadirachtin B. Da das Proton an C-17 fehlt, wird das Kopplungsmuster der beiden Protonen an C-16 (2,16 und 2,07 ppm) einfacher. Wegen der geminalen Kopplung und der Kopplung zu H-15 bilden sie Doppeldoublets. Die chemischen Verschiebungen von H-16 sind ähnlich wie die von H-2. Die chemische Umgebung muß dann auch ähnlich sein. In beiden Fällen sind sie an C-Atome gebunden, die jedes eine Sauerstofffunktion tragen. Die Methylgruppe C-18 ist von 2,0 ppm auf 1,51 ppm verschoben. Dies ist die typische Lage für

Methylgruppen an einer Doppelbindung. Leider war nicht genügend Substanz vorhanden, um ein ^{13}C -NMR-Spektrum zu messen. Die neu entstandene Doppelbindung müsste im ^{13}C -Spektrum nachweisbar sein. Eine derartige Doppelbindung wurde bei 23~~x~~-Ethoxy-17-hydroxy-13,14-deepoxy-22,23-dihydro-azadirachtin B nachgewiesen. Nachdem diese beiden Substanzen ein beinahe identisches Protonenspektrum haben, kann man auch von einer gleichen Struktur ausgehen. F.P. 141-143 °C; λ_{max} 206nm (s.S. 12)

Tabelle 8. Zuordnung der Resonanzsignale aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Azadirachtin G

Proton	^1H -Res. (ppm)	M, J (Hz)	Proton	^1H -Res. (ppm)	M, J (Hz)
1	5,63	t,2,8	21	5,58	s
2a	2,16	dt,17;2,8	22	4,83	d,2,9
2b	2,07	dt,17;2,8	23	6,32	d,2,9
3	3,60	t,2,8	28a	3,91	d,8,9
5	3,06	d,12,5	28b	3,49	d,8,9
6	4,30	dd,12,5;2,9	30	1,38	s
7	4,59	d,2,9	OMe	3,75	s
9	3,25	d,<1	OMe	3,69	s
11	4,62	d,<1	Tigloyl:		
15	4,13	dd,1,3;<1	3'	6,83	q,7,0
16a	1,82	dd,13,4;1,3	4'	1,78	d,7,0
16b	2,16	dd,13,4;<1	5'	1,78	s
18	1,51	s	OH(17)	6,04	
19a	3,89	d,9,7	OH(1)	2,42	
19b	3,53	d,9,7	OH(20,7)	3,69	

Die NMR-Spektren von Azadirachtin G sind im Anhang als Abb. A 10 (^1H -NMR) und Abb. A 11 (COSY) dargestellt.

2.9. Struktur weiterer Neem-Inhaltsstoffe

In den vergangenen 20 Jahren wurden weitere Inhaltsstoffe des Neembbaums (*Azadirachta indica*) isoliert und deren Struktur und biologische Wirksamkeit untersucht. Bei den meisten Substanzen handelt es sich um unpolare Tetra-nortriterpenoide wie Salannin⁷⁷ und Nimbin⁷⁸, die auf verschiedene Testinsekten als Fraßhemmer wirken.

Erst in den letzten Jahren wurden auch von anderen Arbeitsgruppen polare Substanzen aus Neem isoliert, die eine den Azadirachtinen ähnliche Struktur besitzen. Eine Zusammenfassung dieser Substanzen wurde kürzlich von Kraus¹⁴ gegeben. Darin werden einige Substanzen beschrieben, die den in der vorliegenden Arbeit isolierten strukturell ähnlich sind: Das in dem erwähnten Übersichtsartikel beschriebene 1-Cinnamoyl-3-feruloyl-11-hydroxymeliacarpin unterscheidet sich von Azadirachtin D nur durch andere Substituenten an C-1 und C-3.

In der Zusammenfassung von Kraus¹⁴ werden zudem einige Neem-Inhaltsstoffe beschrieben, die sich strukturell von den Azadirachtinen ableiten, deren Dihydrofuran-Doppelbindung jedoch durch die Addition von Methanol derivatisiert ist. Das ist deshalb überraschend, weil bei den in der vorliegenden Arbeit isolierten Verbindungen die Dihydrofuranfunktion immer erhalten war.

Eine biologische Aktivität der von Kraus beschriebenen Substanzen wird nicht angegeben. Es ist zu vermuten, daß die an C-13/C-14 eine Epoxidfunktion tragenden Verbindungen auch eine wachstumshemmende Wirkung ausüben. Dies ist jedoch nur ein Analogieschluß, der aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse erlaubt sein mag.

III.3. Derivate von Azadirachtin A und von Azadirachtin B

Die Derivate wurden hergestellt, um eine möglichst große Anzahl von Verbindungen mit weitgehend ähnlicher Struktur im Biotest untersuchen zu können. Es war das Ziel, jeweils nur eine funktionelle Gruppe im Azadirachtinmolekül zu verändern, damit eine klare Aussage über die Bedeutung dieser Gruppe für die biologische Wirksamkeit möglich ist. Dabei konnten nur Derivate von Azadirachtin A und Azadirachtin B hergestellt werden, da nur von diesen genügende Substanzmengen vorhanden waren.

Aufgrund der hohen Reaktivität der Moleküle war es nicht möglich, alle funktionellen Gruppen definiert zu verändern. So wäre es für die Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehung interessant, die OH-Gruppe an C-7 zu maskieren. Als Ergebnis solcher Bemühungen wurden jedoch drei neue, in ihrer Struktur überraschende Derivate erhalten. Bei den meisten Versuchen zersetzte sich das Azadirachtin derart, daß überhaupt kein Hauptprodukt isoliert werden konnte.

3.1. 22,23-Dihydroazadirachtin A

Die Verbindung wurde durch katalytische Hydrierung von Azadirachtin A mit PtO_2 als Katalysator in einer Ausbeute von 28,2mg (=69% d.Th.) erhalten (s. S. 13).

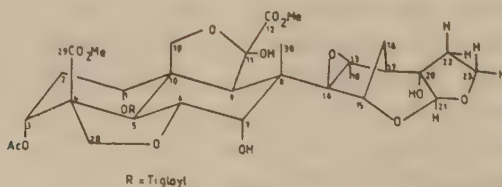


Abb.19. Struktur von 22,23-Dihydroazadirachtin A

Das Molekulargewicht von 722 wurde mit FAB-Neg.-MS bestimmt. Im Protonen-NMR-Spektrum sind die Resonanzsignale der Furan-Doppelbindung verschwunden. Dafür erscheinen die

Signale der vier Protonen an C-22 und C-23 bei 2,12; 1,98; 3,98 und 3,87 ppm. Verschiebungen im Vergleich mit dem Spektrum des Azadirachtin A gibt es nur bei H-21 mit 0,41 ppm und bei H-16b mit 0,17 ppm. Diese beiden Protonen liegen der Furan-Doppelbindung sehr nahe. Deshalb ist bei diesen beiden Protonen auch der größte Effekt zu erwarten, wenn die Doppelbindung hydriert wird. Die anderen Protonen im Spektrum sind identisch mit denen von Azadirachtin A. Die vollständigen Protonenresonanzen von 22,23-Dihydroazadirachtin A sind im Anhang in Tabelle A 2 zusammengefaßt. F.P. 164-167°C; $\lambda_{\max}$ 216,5 nm.

3.2. 22,23-Dihydroazadirachtin B

Die Verbindung wurde analog der vorher genannten durch katalytische Hydrierung hergestellt (s.S.15). Die Ausbeute betrug 65 mg, 68% d. Th.

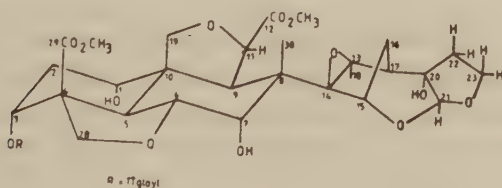


Abb.20. Struktur von 22,23-Dihydroazadirachtin B

Das Molekulargewicht, bestimmt mit FAB-Neg.-MS, beträgt 664. Es wurden zwei Protonen in das Azadirachtin B - Molekül eingefügt. Im ^{13}C -Spektrum ergeben sich daraus nur wenige Unterschiede im Vergleich zur Ausgangssubstanz Azadirachtin B. Die Lage der C-Atome 22 und 23 sowie die Differenzen der chemischen Verschiebungen der umgebenden C-Atome beweisen, daß die Furan-Doppelbindung hydriert wurde, nicht aber die Doppelbindung der Tiglinsäure. Die vollständige Tabelle der ^{13}C -Resonanzen von 22,23-Dihydroazadirachtin B ist im Anhang in Tabelle A 3 abgebildet.

3.3. 3-Detigloyl-3-(2-methylbutyryl)-22,23-dihydroazadirachtin B

Diese Substanz wurde ebenfalls durch Hydrierung an PtO_2 dargestellt, jedoch lag der Katalysator in einem Überschuß von 2:1 zu Azadirachtin B vor. Ausbeute 1,8 mg (=25% d.Th.) Das FAB-Neg.-MS zeigt ein Molekulargewicht von 666. Im ^1H -NMR-Spektrum sind die Signale der Tiglinsäure und der Doppelbindung des Dihydrofuranrings verschwunden. Die vier Protonen an C-22 und C-23 erscheinen ganz ähnlich wie beim 22,23-Dihydroazadirachtin A.

Durch die Hydrierung ergeben sich Verschiebungen an H-21 um 0,48 ppm und an H-16a um -0,19 ppm. Die restlichen Protonenresonanzen im rechten Teil des Moleküls sind nicht betroffen.

Anstelle der Tiglinsäure-Resonanzen erscheinen die Resonanzsignale der 2-Methylbuttersäure:

H-Atom	^1H -Res (ppm)	M	J (Hz)
2	2,34	m	
3a	1,65	m	
3b	1,42	m	
4	0,86	t	7,4
5	1,10	dd	7,0/1,0

Der Vergleich mit Daten aus der Literatur⁷⁹ zeigt eine sehr gute Übereinstimmung. Die Liste mit allen Protonenresonanzen dieser Substanz ist im Anhang in Tabelle A 4 abgebildet.

3.4. 11-Acetylazadirachtin A

Diese Verbindung wurde durch Acetylierung von Azadirachtin A mit Essigsäureanhydrid bei erhöhter Temperatur dargestellt (s.S.13). Die Ausbeute betrug 6,7 mg (=6,1% d.Th.)

Mit FAB-Neg.-MS wurde das Molekulargewicht mit 762 festgestellt.

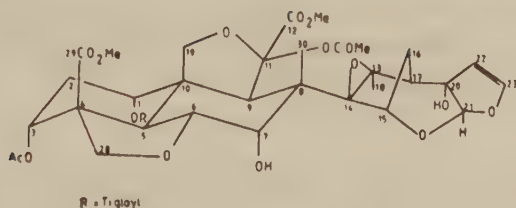


Abb.21. Struktur von
11-Acetylazadirachtin A

Es wurde eine Acetylgruppe in das Molekül eingeführt. Im NMR-Spektrum ist die zusätzliche Methylgruppe bei 1,89 ppm zu erkennen. An H-19 und H-9 treten Differenzen zu Azadirachtin A auf. Die beiden Protonen sind in der Nachbarschaft der Hydroxylgruppe an C-11. Daher kann nur diese Hydroxylgruppe verestert sein. Bei einer Veresterung an OH-20 müßten an H-17, H-22 und H-23 Verschiebungen auftreten. Bei einer Acetylierung an OH-7 müßte das Proton H-7 verschoben sein. OH-7 wird nicht acetyliert, obwohl es als sekundäre Hydroxylgruppe am ehesten dafür geeignet scheint. OH-11 und OH-20 sind tertiäre Hydroxylgruppen. Von anderer Seite⁸⁰ wurde bereits berichtet, daß Hydroxylgruppen an C-7 bei Verbindungen dieses Typs nur schwer zu acetylieren sind. Eine Liste mit allen Protonenresonanzen dieser Verbindung ist im Anhang in Tabelle A 5 zusammengestellt. F.P. 157-160 °C; $\lambda_{\max}$ 206,5 nm

3.6. 3-Detigloylazadirachtin B

Die Substanz wurde durch alkalische Verseifung in wässrigem Methanol aus Azadirachtin B in einer Ausbeute von 5,2 mg, entsprechend 26% d. Th., erhalten. Vgl. dazu S.15.

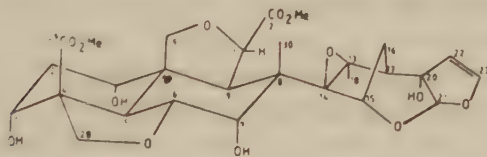


Abb.23. Struktur von 3-Detigloylazadirachtin B

Das FAB-Neg.-MS ergab ein Molekulargewicht von 580. Im ^1H -NMR-Spektrum sind die Resonanzen der Tiglinsäure verschwunden. Im Vergleich mit Azadirachtin B gibt es einige Verschiebungen, die beweisen, daß sich in den Azadirachtin B Derivaten die Tiglinsäure an Position 3 befindet. Die folgenden Protonen sind verschoben:

H-Atom	^1H -Res. (ppm)
1	-0,12
2b	0,24
3	1,20
5	0,23
9	0,18
28a	-0,20
28b	-0,25

Die große Verschiebung an H-3 ist auf die Hydrolyse der Tiglinsäure an diesem C-Atom zurückzuführen. Die anderen Differenzen gehen auf einen Anisotropieeffekt der Tiglinsäure zurück, der beim Detigloyl-Derivat fehlt. Der Effekt auf die Protonen von C-28 wäre nicht möglich, wenn die Tiglinsäure an C-1 gebunden wäre. Im Kalottenmodell ist

zu erkennen, daß die Tiglinsäure im Azadirachtin frei nach außen wegsteht. Eine andere Konfiguration ist aufgrund der Kompaktheit des Moleküls nicht möglich⁷². Die Liste mit allen Protonenresonanzen dieser Substanz befindet sich im Anhang in Tabelle A 7. Das ^1H -NMR-Spektrum ist im Anhang in Abb. A 12 dargestellt. F.P. $145\text{--}146^\circ\text{C}$, λ_{max} 196 nm.

3.7. 23 α -Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A und 23 β -Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A

Die beiden Substanzen entstanden durch Behandlung von Azadirachtin A mit Acetylchlorid (s.S.14). Dabei wurden 5,2 mg α -Derivat und 2,4 mg β -Derivat erhalten.

Mit Essigsäureanhydrid ist es gelungen, ein Monoacetat des Azadirachtins A herzustellen. Mit Acetylchlorid sollte ein Di- oder Triacetat erhalten werden. Es erfolgte aber keine Acetylierung, sondern eine Anlagerung von Ethanol an die Dihydrofuranandoppelbindung. Der Reaktionsmechanismus ist unbekannt, nachdem bei keinem Schritt Ethanol verwendet worden ist. Bei Wiederholung des Versuchs mit Benzoylchlorid als Reagenz wurde in einer deutlich langsameren Reaktion das 23 α -Ethoxy-Derivat als einziges Produkt erhalten. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch beim Azadirachtin B gemacht. Die Behandlung mit Acetylchlorid ergab dort eine Addition von Ethanol an die Furan-Doppelbindung; zusätzlich wurde das Epoxid zu einem Allylalkoholderivat umgelagert.

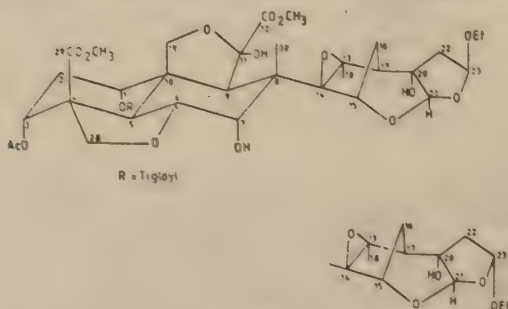


Abb. 24. Struktur von 23 β -Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A (oben) und 23 α -Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A (unten)

Mit FAB-Neg.-MS wurde das Molekulargewicht beider Substanzen mit 766 bestimmt. Der Unterschied zu Azadirachtin A beträgt 46 Masseneinheiten. Das entspricht dem Molekulargewicht von Ethanol. Bei beiden Substanzen fehlen im Protonen-NMR-Spektrum die Resonanzen von H-22 bei 5,04 ppm und von H-23 bei 6,45 ppm. In beiden Verbindungen erscheinen acht neue Protonen. Eines davon ist bei 5,24 ppm und liegt damit ganz ähnlich wie H-21. Es handelt sich um H-23, das in diesen Verbindungen ein Ketal-Proton ist. Die beiden Protonen von H-22 liegen bei etwa 2,2 ppm. Die Methylgruppe des Ethylsubstituenten erscheint als Triplet bei 1,18 ppm. Die Kopplungskonstante beträgt 7,0 Hz. Die beiden diastereotopen Protonen der CH₂-Gruppe bilden getrennte Quartette bei 3,45 ppm und 3,48 ppm. Beim 23-Derivat ist H-21 um 0,13 ppm gegenüber Azadirachtin A verschoben. Im 23-Derivat beträgt die Verschiebung von H-21 0,25 ppm. Vor allem fällt hier die starke Verschiebung von H-16b um 0,67 ppm zu tiefem Feld auf. Die Addition erfolgt so, daß die Ethylgruppe in sterischen Kontakt mit H-16b kommt. Eine Liste mit allen Protonenresonanzen befindet sich im Anhang in Tabelle A 8. Zu den physikalischen Daten vgl. Seite 14. Daten s. S. 14.

3.8. 23 α -Ethoxy-13,14-deepoxy-17-hydroxy-22,23-dihydro-azadirachtin B

Diese Substanz entstand nach Behandlung von Azadirachtin B mit Acetylchlorid (s.S. 19) mit einer Ausbeute von 4,4 mg (20% d. Th.).

Im ¹H-NMR können die Protonen C-22 und C-23 sowie die Ethoxygruppe an C-23 analog den Ethoxygruppen von Azadirachtin A zugeordnet werden. Im linken Teil des Moleküls gibt es keine Veränderungen zu Azadirachtin B. Im rechten Teil fehlt das Muster von H-15/H-16/H-17. Die Protonensignale von C-15 und C-16 sind vorhanden, nicht aber die von C-17. Die Protonen an C-16 sind nach 2,16 und 2,07 ppm zu tiefem Feld verschoben, H-15 erfährt einen

Hochfeldseite um 2,40 ppm zu 4,16 ppm. Die Methylgruppe C-16 wird von 1,02 ppm zu 1,54 ppm verschoben (Differenz 0,46 ppm). Die chemischen Verschiebungen von C-16 deuten darauf hin, daß sie eine ähnliche chemische Umgebung wie die Protonen von C-2 haben. In diesem Fall muß C-17 eine Hydroxylgruppe tragen. Die Resonanz dieses Hydroxylprotons erscheint bei 6,04 ppm. Im ^{13}C -DEPT-Spektrum ist die Resonanz von C-17 verschwunden. Statt dessen erscheint die Resonanz eines quartären C-Atoms bei 86,5 ppm, die nur dem C-17 zugeordnet werden kann. Die Signale von C-13 und C-14 sind zu 91,7 und 95,0 ppm verschoben. Dies ist der Bereich für C-Atome mit einer Doppelbindung. Aufgrund dieser Hinweise kann man als sicher annehmen, daß in diesem Molekül der Epoxidring einer C-C-Doppelbindung gewichen ist und daß an C-17 eine Hydroxylgruppe steht.

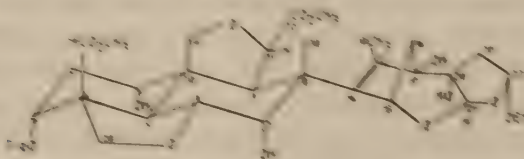


Abb. 25. Struktur von 13 α -Ethoxy-11,13-dihydro-13,14-diepoxy-17-hydroxy-asadirachtin B

Ein ganz ähnliches Protonenspektrum hat auch Asadirachtin G. Der Unterschied der beiden Moleküle liegt darin, daß in Asadirachtin G der Dihydrofuranring intakt ist, während in dem hier behandelten Molekül Ethanol an die Doppelbindung angelagert wurde. Die Protonen- und Kohlenstoffspektren der Substanz sind im Anhang in den Abbildungen A 13 und A 14 dargestellt. Dort ist in Tabelle A 9 eine vollständige Liste der NMR-Resonanzen dieser Substanz aufgeführt. F.P. 170-174°C; λ_{max} 216 nm.

III.4. Der biologische Test

4.1. Allgemeines

Alle beschriebenen Azadirachtine rufen in Abhängigkeit von der Testkonzentration drei unterschiedliche Wirkungen bei Epilachna varivestis hervor:

a) In hoher Konzentration (>1000 ppm) wirken sie toxisch; d.h. die im Test eingesetzten Larven überleben den Kontakt mit Azadirachtin nur für wenige Stunden.

b) In Konzentrationen um 100 ppm sind sie Fraßhemmer.

c) In Konzentrationen zwischen 1 und 10 ppm hemmen sie die Entwicklung der Larven, ohne die Futteraufnahme zu beeinflussen. Hier entsprechen sie also der eingangs gegebenen Definition, im Biotest Wachstumshemmer ohne gleichzeitige Fraßhemmung zu sein.

4.2. Das Testsystem

Für die Untersuchungen der biologischen Wirksamkeit wurde der Epilachna-Käfigtest verwendet⁶⁵. Junge Bohnenpflanzen wurden mit einer methanolischen Lösung definierter Konzentration der zu testenden Substanz eingesprüht. Zur Kontrolle wurden Pflanzen in der gleichen Weise mit Methanol behandelt. Dann wurden Larven des Mexikanischen Bohnenkäfers (Epilachna varivestis) im vierten Stadium auf diese Bohnenpflanzen gesetzt, dort 48 Stunden lang belassen, dann auf unbehandelte Pflanzen umgesetzt und ihre Entwicklung bis zum erwachsenen Käfer weiter verfolgt. Die Konzentration, bei der die Hälfte der zu Versuchsbeginn eingesetzten Larven das Adultstadium erreichte, wurde als MC_{50} (Metamorphose-störende Konzentration bei 50% der eingesetzten Tiere) bezeichnet.

4.3. Toxische Wirkung

Da die toxische Wirkung hoher Azadirachtin-Konzentrationen unspezifisch ist, war eine Bestimmung dieser Giftwirkung im biologischen Test uninteressant.

4.4. Fraßhemmung

Eine Fraßhemmung bewirkt eine Phase des Hungerns bei den Testtieren. Dadurch wird die Entwicklung zum Adulten verzögert. Nachdem in dieser Arbeit Wachstumsstörungen beobachtet werden sollten, die durch Azadirachtine hervorgerufen werden, war es nötig, eine Überlagerung der Effekte durch Fraßhemmung bei den angewendeten Konzentrationen auszuschließen. Deshalb wurden durch einen Vergleich der Gewichtszunahme bei den Testtieren während des Kontakts mit Azadirachtin mit den Kontrolltieren jene Konzentrationen bestimmt, bei denen eine Fraßhemmung beobachtet wird. Allerdings standen die für den Fraßtest nötigen Konzentrationen nicht bei allen Azadirachtinen zur Verfügung.

Die Abbildungen 26 und 27 zeigen die relative Gewichtszunahme (RG) der Bohnenkäfer nach Behandlung mit zwei natürlichen und zwei synthetischen Azadirachtinen.

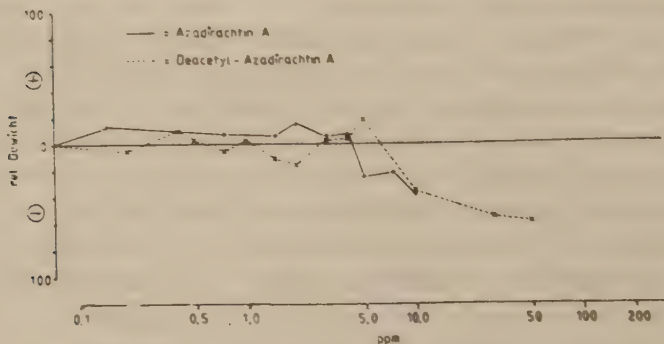


Abb. 26. Rel. Gewichtszunahme der Bohnenkäfer in Abhängigkeit von der Testkonzentration. Eine merkliche Fraßhemmung zeigt sich erst ab etwa 5 ppm. Die MC_{50} von Azadirachtin A beträgt 1,66 ppm, von Deacetylazadirachtin A 0,38 ppm

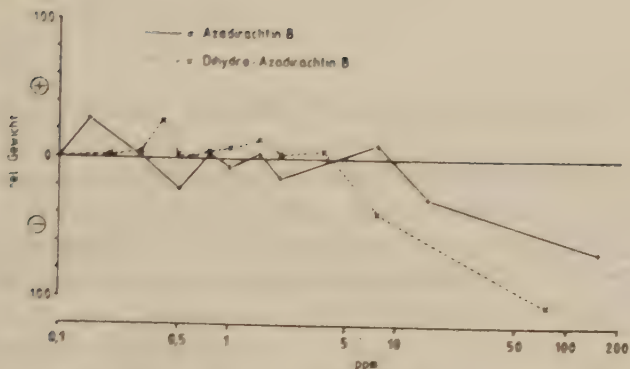


Abb. 27. Rel. Gewichtszunahme der Bohnenkäfer in Abhängigkeit von der Testkonzentration. Eine merkliche Fraßhemmung zeigt sich zwischen 5 und 10 ppm. Die MC_{50} von Azadirachtin B beträgt 1,30 ppm, die von 22,23-Dihydroazadirachtin B 0,28 ppm

RG wurde für die jeweilige Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$RG = \left(\frac{(G2V) - (G0V)}{(G0V)} \right) - \left(\frac{(G2K) - (G0K)}{(G0K)} \right)$$

RG = relative Gewichtszunahme der Versuchstiere

G2V = Gewicht der Versuchstiere am Tag 2

G0V = Gewicht der Versuchstiere am Tag 0

G2K = Gewicht der Kontrolltiere am Tag 2

G0K = Gewicht der Kontrolltiere am Tag 0

Eine positive Zahl zeigt an, daß die Versuchstiere einen stärkeren Gewichtszuwachs zu verzeichnen hatten als die Kontrolltiere, eine negative Zahl dagegen eine Fraßhemmung. Wurden mehrere Versuche mit der gleichen Testkonzentration durchgeführt, dann wurden Standardabweichungen berechnet, die jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in die Abbildungen eingezeichnet sind; sie lagen bei etwa 20 Einheiten auf der Ordinate.

Bei den hier gezeigten wie auch bei den anderen Azadirachtinen zeigt sich eine Fraßhemmung erst ab 10 ppm. Der Bereich für die Metamorphosestörungen liegt bei etwa 1 ppm. Daher kann bei Konzentrationen um 1 ppm diese Wirkung ohne Einfluß der Fraßhemmung beobachtet werden.

4.5. Wachstumsstörungen durch Azadirachtin

Unter Normalbedingungen entsteht bei der Entwicklung des Mexikanischen Bohnenkäfers nach dem Durchlaufen von vier Larvenstadien aus dem vierten Stadium eine Vorpuppe, die nach 2 Tagen in das Puppenstadium übergeht. Aus der Puppe schlüpft dann das erwachsene Tier.

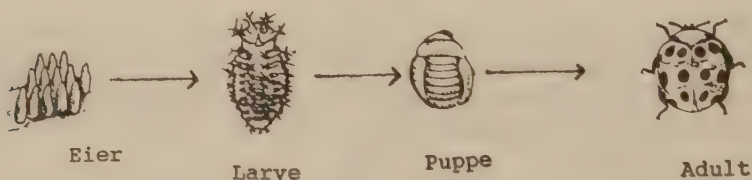


Abb. 28. Schematische Darstellung der Entwicklung des Mexikanischen Bohnenkäfers (*Epilachna varivestis*). Es werden vier Larvenstadien durchlaufen, von denen nur eine dargestellt ist. Zwischen Larve und Puppe gibt es noch ein sogenanntes Vorpuppenstadium, bei dem die Tiere das Verhalten einer Puppe, aber das Aussehen einer Larve haben (aus: loc. cit.⁸¹⁾)

Azadirachtin kann bei dieser Entwicklung verschiedenartige Wachstumsstörungen auslösen:

- a) Die Versuchstiere entwickeln sich nicht weiter und verbleiben zum Teil im Larvenstadium. Nach einigen Tagen hören sie zu fressen auf und verhungern auf den frischen Bohnenpflanzen.
- b) Konnte sich die Larve noch zur Vorpuppe entwickeln, trocknet diese aus oder bildet Öffnungen, aus denen Körperflüssigkeit ausläuft. In beiden Fällen stirbt die Vorpuppe.
- c) Es entsteht noch eine normale Puppe, dem erwachsenen Käfer gelingt es aber nicht, die Puppenhülle abzustreifen. In diesen Fällen kann sich kein lebensfähiges erwachsenes Tier entwickeln.
- d) Ein erwachsenes Tier schlüpft noch aus der Puppenhülle. Es hat jedoch Deformationen, z.B. Spreizflügel, schwarze Beine, Deformationen der Kauwerkzeuge etc. Diese Tiere sterben einige Stunden später ab.

Im Hinblick auf das eben Gesagte kann man deshalb die Azadirachtine als Metamorphoseinhibitoren bezeichnen.

Für die quantitative Auswertung der biologischen Tests wird der Wert MC_{50} benützt, d.h. Metamorphoseinhibition bei 50 % der Tiere für eine bestimmte unter Standardbedingungen getestete Azadirachtinkonzentration.

Es war die Konzentration zu ermitteln, bei der unter Ausschluß der Fraßhemmung nur noch die Hälfte der eingesetzten Tiere das Erwachsenenstadium erreichten. Eine Fraßhemmung war deshalb auszugrenzen, weil bei hungernden Tieren die gleichen Störungen auftreten können wie bei einer wachstumshemmenden Wirkung. Die beiden Effekte sind dann nicht zu unterscheiden.

4.6. Quantitative Auswertung des Wachstumstests

Von jeder Substanz wurden mehrere Konzentrationen getestet, wobei für jede Konzentration ein entsprechender Metamorphoseinhibitionswert erhalten wurde. Aus diesen wurde nach Noack und Reichmuth⁸² die wirksame Konzentration für 50% der Tiere (MC_{50}) berechnet.

Mit Hilfe eines Rechenprogramms erstellt man durch Regressionsrechnung eine Ausgleichsgerade. Die Probit-Werte (eine Rechengröße innerhalb des verwendeten Programms) werden dabei gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Aus der Ausgleichsgeraden läßt sich der Wert für die MC_{50} bestimmen. Die Güte des Zusammenhangs zwischen Ordinaten- und Abszissenwerten wurde mit einer Korrelationsrechnung überprüft.

In Tabelle 10 ist dieser Zusammenhang durch den Korrelationskoeffizienten r ausgedrückt. Er kann zwischen 0 und 1 liegen. Dabei besteht keine lineare Korrelation zwischen den Probit-Werten und $\log C$, wenn r nahe 0 ist. Ein statistisch gesicherter linearer Zusammenhang besteht, wenn r nahe 1 liegt. Der Wert $\mathcal{J}$ stellt dafür eine objektive Prüfgröße dar:

$$T = \sqrt{(N-2) \frac{r^2}{1 - r^2}}$$

r=Korrelationskoeffizient
N=Anzahl der Versuche

T wird mit den Signifikanzschranken der t-Verteilung für die statistischen Sicherheiten 95%, 99% und 99,9% verglichen. Nach einem Vorschlag von Gottschalk⁸³ kommt man zu folgenden Kriterien:

Ein linearer Zusammenhang ist statistisch bei

$T \leq t(95\%)$	nicht nachweisbar (n)
$t(95\%) < T < t(99\%)$	wahrscheinlich (w)
$t(99\%) < T < t(99,9\%)$	gesichert (s)
$T \geq t(99,9\%)$	stark gesichert (ss)

In Tabelle 10 (S.59) werden für die einzelnen Substanzen der Korrelationskoeffizient r und die Wertung für den statistisch nachweisbaren linearen Zusammenhang angegeben.

4.7. Beispiel für die Ermittlung eines MC_{50} -Werts

Als Beispiel für die Ermittlung eines MC_{50} -Werts soll Azadirachtin D dienen. Mit Azadirachtin D wurden 13 Epilachna-Tests durchgeführt. Die Testergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Für jeden Test wurden 20 Tiere eingesetzt. Die bis zum Testende gestorbenen Tiere wurden gezählt und daraus eine Mortalitätsrate ermittelt. Aus den Mortalitätsraten der Kontrolltiere (11% der Tiere starben bei der Kontrolle) und der Testtiere wurde die korrigierte Mortalitätsrate für jede Testkonzentration berechnet.

Mit Hilfe des auf Seite 55 erwähnten Computerprogramms wurden daraus Probit-Werte ermittelt, die gegen den Logarithmus der Testkonzentration aufgetragen wurden. Aus diesen Werten wurde eine Ausgleichsgerade berechnet. Der Probit-Wert 5 gibt an, daß 50% der Tiere an Metamorphosestörung gestorben sind. Aus der Ausgleichsgeraden (s. Abb.29)

ist dann der MC_{50} -Wert abzulesen, der im Fall von Azadirachtin D 1,57ppm beträgt.

Tabelle 9: Ergebnisse des Epilachna-Tests für Azadirachtin D

Test-Nr.	Konz. (ppm)	einges. Tiere	gestorb. Tiere	Korr.Mort. Rate	Probit- Wert
1	1,0	20	8	32,58	4,55
2	2,0	20	16	77,53	5,76
3	3,0	20	19	94,38	6,59
4	1,0	20	3	4,49	3,30
5	2,0	20	17	83,15	5,96
6	0,8	20	3	4,49	3,30
7	1,0	20	13	60,67	5,27
8	1,5	20	16	77,53	5,76
9	1,0	20	5	15,73	3,99
10	1,5	20	7	26,97	4,39
11	2,0	20	9	38,20	4,70
12	0,8	20	3	4,49	3,30
13	4,0	20	19	94,38	6,59

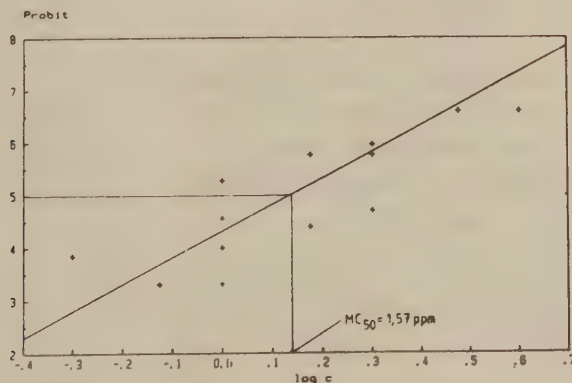


Abb. 29. Ermittlung der MC_{50} von Azadirachtin D aus der Ausgleichsgeraden. Die auf der Ordinate aufgetragenen Probit-Werte sind Rechengrößen für die Wirkung der Verbindung. Ein Probit-Wert 5 bedeutet, daß nach Ende des Tests die Hälfte der Tiere gestorben war.

4.8. Ergebnis der Epilachna - Tests

Die mit dem beschriebenen Testsystem ermittelten MC_{50} -Werte sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Je kleiner der MC_{50} -Wert ist, umso wirksamer ist die jeweils getestete Verbindung. Der berechnete MC_{50} -Wert liegt im Bereich der angegebenen oberen und unteren mittleren quadratischen Abweichungen. Die Streuung der einzelnen Testergebnisse um die Ausgleichsgerade ist durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten r angegeben. Dieser Korrelationskoeffizient r ist ein Maß für die Streuung der einzelnen Meßpunkte um die Ausgleichsgerade. Wenn $r = 1$ ist, liegen alle Meßpunkte auf der Ausgleichsgeraden. Dieser Fall wird am leichtesten erreicht, wenn nur wenige Messungen vorliegen, wie z.B. bei den Substanzen II und VII. Bei sehr vielen Messungen, wie bei Substanz I (Azadirachtin A, das oft als Referenz benützt wurde), wird die Streuung um die Ausgleichsgerade größer und dementsprechend der Korrelationskoeffizient kleiner. Dennoch sind die Werte bei diesen Substanzen (z.B. I, IV, VIII) statistisch besser abgesichert, wie in der letzten Spalte der Tabelle 10 angegeben wurde. Nach den auf Seite 56 diskutierten Gesichtspunkten wurde die statistische Absicherung mit folgenden Abkürzungen bewertet:

- n = statistisch nicht gesichert
- w = statistisch wahrscheinlich
- s = statistisch gesichert
- ss = statistisch stark gesichert

Tabelle 10: Metamorphose-Inhibition im Epilachna-Test für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Azadirachtine und ähnliche Verbindungen (vgl. dazu S. 58). Die Anzahl der durchgeführten Versuche (n), die MC_{50} -Werte, die Korrelationskoeffizienten r und die Einschätzungen für die statistische Absicherung sind angegeben.

Substanz	Nummer	n	MC_{50} (ppm)	r	stat.	Sich.
Azadirachtin A	I	40	$1,66 \pm 0,17$	0,78	SS	SS
22,23-Dihydroazadirachtin A	II	6	$1,26 \pm 0,37$	0,91	W	W
11-Acetylazadirachtin A	III	13	$8,68 \pm 2,92$	0,69	S	S
3-Deacetylazadirachtin A	IV	31	$0,38 \pm 0,09$	0,67	SS	SS
23 α -Ethoxy-22,23-dihydroazad.A	V	19	$0,74 \pm 0,17$	0,66	S	S
23 β -Ethoxy-22,23-dihydroazad.A	VI	7	$0,52 \pm 0,15$	0,91	S	S
Azadirachtin B	VII	19	$1,30 \pm 0,30$	0,73	SS	SS
22,23-Dihydroazadirachtin B	VIII	27	$0,28 \pm 0,07$	0,69	SS	SS
3-Detigloyl-3-(2-methylbutyryl)- 22,23-dihydroazadirachtin B	IX	17	$0,45 \pm 0,11$	0,74	SS	SS
3-Detigloylazadirachtin B	X	13	$0,08 \pm 0,12$	0,80	S	S
23 α -Ethoxy-22,23-dihydro-13,14- deepoxy-17-hydroxyazadirachtin B	XI	8	>100			
Azadirachtin C	XII	8	$12,97 \pm 6,4$	0,92	S	S
Azadirachtin D	XIII	15	$1,57 \pm 0,16$	0,90	SS	SS
Azadirachtin E	XIV	25	$2,80 \pm 0,57$	0,73	SS	SS
Azadirachtin F	XV	18	$1,15 \pm 0,17$	0,65	S	S
Azadirachtin G	XVI	16	$7,69 \pm 2,77$	0,65	S	S
Salannin	XVII	4	>100			

n = Anzahl der durchgeführten Versuche, r = Korrelationskoeffizient

Zusammenfassend läßt sich aus Tabelle 10 feststellen:

Die aktivsten Verbindungen sind die Substanzen IV, V, VI, VIII, IX und X mit MC_{50} -Werten zwischen 0,08 und 0,74 ppm. Diese Verbindungen haben eine höhere Aktivität als die Azadirachtine A(I) und B(VII), die zusammen mit II, XIII, XIV, XV eine mittlere Aktivität besitzen (MC_{50} 1,15 - 2,80 ppm).

Wenig aktiv sind die Substanzen III, XII und XVI (MC_{50} 7.69 - 12,97 ppm).

Bei allen diesen Verbindungen lagen die getesteten Konzentrationen deutlich unter jenen, bei denen eine Fraßhemmung auftrat(s.S.52).

Die Substanzen XI und XVII zeigten keinerlei metamorphosehemmende Wirkung, Salannin (XVII) jedoch schon ab 50 ppm eine stark fraßhemmende Wirkung.

III.5. Struktur-Wirkungs-Beziehungen

In den Abschnitten III.1. und III.2. wurden Azadirachtine und einige Derivate sowie deren biologische Wirkung auf die Metamorphose von Insekten am Beispiel des Mexikanischen Bohnenkäfers (*E. varivestis*) beschrieben. In dem nun folgenden Abschnitt wird versucht, durch Vergleich der beschriebenen Strukturen mit ihrer jeweiligen Aktivität jene Strukturmerkmale zu erkennen, die für die biologische Wirksamkeit notwendig und wesentlich sind. Zur nachfolgenden Diskussion soll die Formel von Azadirachtin A hier nochmals angegeben werden.

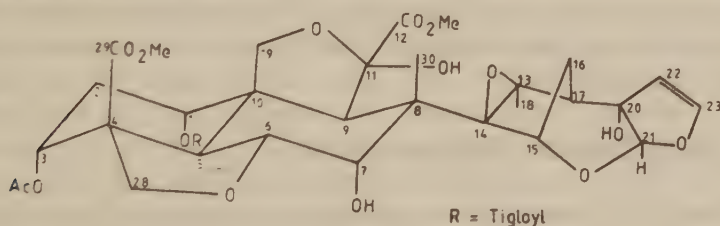


Abb.30. Struktur von Azadirachtin A

Zur besseren Übersichtlichkeit sind alle Formeln der nachfolgend genannten Verbindungen auf einem Faltblatt am Ende dieser Arbeit zusammengestellt. Die Ergebnisse der Struktur-Wirkungs-Betrachtungen werden zusammengefaßt und ein Vorschlag für eine "minimale Wirkstruktur" wird unterbreitet.

Bei der Betrachtung der Struktur der Azadirachtine fallen einige Strukturelemente auf, die getrennt diskutiert werden können:

Das Dekalinsystem mit den Ringen A und B ist in den untersuchten Verbindungen teilweise unterschiedlich substituiert. Die Auswirkungen dieser Veränderungen auf die biologische Aktivität werden im Teil III.5.1 dieses Kapitels

diskutiert.

Im rechten Teil des Moleküls fällt der Dihydrofuranring auf. Im Abschnitt III.5.2 wird die Auswirkung von Änderungen am Dihydrofuranring diskutiert. Bei der Betrachtung des Kalottenmodells von Azadirachtin ist auffallend, daß der Dihydrofuranring frei nach außen steht und sterisch nicht behindert wird.

Es standen nur wenige Substanzen zur Verfügung, die sich im Bereich des Epoxidrings unterschieden. Dennoch kann festgestellt werden, daß die Epoxid-Funktion von großer Bedeutung für die Wirkung ist (Kap. III.5.4).

Im Kalottenmodell kann man sehen, daß die Epoxidfunktion von den Substituenten an C-11 sterisch gehindert werden kann. Die Frage, ob diese Hinderung Auswirkungen auf die biologische Wirkung hat, wird im Teil III.5.3 dieses Kapitels diskutiert.

5.1. Substituenten an Ring A und B

In Tabelle 11 sind sieben Substanzen aufgeführt, die sich nur durch Substituenten am Dekalinsystem (Ringe A und B) unterscheiden.

Tabelle 11. Azadirachtine mit unterschiedlichen Substituenten an den Ringen A und B

Substanz	MC ₅₀ (ppm)
Azadirachtin A (I)	1,66
Deacetylazadirachtin A (IV)	0,38
Azadirachtin B (VII)	1,30
Detigloylazadirachtin B (X)	0,08
Azadirachtin D (XIII)	1,57
Azadirachtin E (XIV)	2,80
Azadirachtin F (XV)	1,15

Der Vergleich der Aktivitäten von Substanz I mit IV und Substanz VII mit X zeigt, daß die Aktivität ansteigt, wenn die Hydroxylgruppe an C-3 frei ist. Ist C-3 belegt, so ergibt sich keine Veränderung der Aktivität gegenüber der Stammverbindung Azadirachtin A, wie ein Vergleich der Substanzen XIII, XIV, XV mit Substanz I zeigt.

Wenn nur die Hydroxylgruppe an C-1 frei ist, ist keine eindeutige Tendenz erkennbar; zum Vergleich hierzu die Substanzen I, IV, XIII, XV mit belegter Hydroxylgruppe C-1 und die Substanzen VII, X, XIV, deren C-1 Hydroxyl nicht besetzt ist. Die höchste Aktivität zeigt das Azadirachtin-Derivat (X) mit freien Hydroxylgruppen an C-1 und C-3.

Das Azadirachtinmolekül hat im Kalottenmodell im diskutierten Bereich eine vergleichbare räumliche Ausdehnung wie das Ecdyson, das als Häutungshormon eine wesentliche Rolle bei der Metamorphose spielt. Die beiden Hydroxylgruppen an C-1 und C-3 stehen im Azadirachtin ähnlich weit voneinander entfernt, wie die beiden Hydroxylgruppen C-2 und C-3 im Ecdyson. Die beiden Hydroxylgruppen könnten deshalb ähnlich stark am Ecdyson-Rezeptorprotein binden, obwohl sie im Azadirachtin meta-, im Ecdyson orthoständig zueinander stehen. Bei der Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde beim Ecdyson gefunden, daß diese beiden Hydroxylgruppen wichtig für die Wechselwirkung des Ecdysons mit seinem Rezeptorprotein sind⁸⁴. Möglicherweise imitiert der unveresterte Ring A der Azadirachtine die 2,3-Diol-Gruppierung des Ecdysons. Die unterschiedliche Aktivität der genannten Azadirachtin-Derivate wäre dann damit zu erklären, daß die Substituenten an C-1 und C-3 im Organismus unterschiedlich schnell hydrolysiert werden. Detigloyl-Azadirachtin B hat bereits freie Hydroxylgruppen, reagiert ohne vorherige Veränderung mit dem postulierten Rezeptor und muß daher bei dieser Gruppe die höchste Aktivität besitzen.

In den anderen Azadirachtinen sind die beiden Hydroxylgruppen mit Essigsäure und Tiglinsäure verestert. Der Tiglinsäureester wird in vivo wesentlich leichter verseift als der Essigsäureester. Deacetyl-Azadirachtin A hat mit

0,38 ppm eine dementsprechend deutlich höhere Aktivität als Azadirachtin E mit 2,80 ppm, welches das Detigloyl-Derivat von Azadirachtin A ist. Die biologische Aktivität ändert sich nicht, verglichen mit Azadirachtin A, wenn beide Substituenten vorhanden sind. Azadirachtin D hat einen MC_{50} -Wert von 1,57 ppm, der sich nicht statistisch signifikant von dem des Azadirachtins A unterscheidet. Die MC_{50} von Azadirachtin B, welches nur Tiglinsäure gebunden hat, ist gegenüber Azadirachtin A kaum verändert. Auch Azadirachtin F (1,15 ppm) hat fast die gleiche Aktivität wie Azadirachtin B (1,30 ppm). Die Position der Tiglinsäure, an C-1 oder C-3, ist also für die biologische Aktivität ohne Bedeutung.

Änderungen oberhalb der Ebene, die durch das Dekalin-System gebildet wird, können offensichtlich in Kauf genommen werden, ohne daß sich die Aktivität ändert. Das zeigen die beiden natürlichen Azadirachtine D und F, die sich in der Wirkung nicht von den Stammverbindungen Azadirachtin A und B unterscheiden. Die strukturellen Unterschiede liegen oberhalb des Dekalin-Gerüsts, an C-29 bzw. C-19.

5.2. Untersuchung des Furan-Teils C-20 - C-23

In den natürlichen Azadirachtinen ist die Doppelbindung im Furanring immer vorhanden. Bei den fünf Verbindungen der Tabelle 12, an denen diese derivatisiert wurde, ist dies gleichzeitig die einzige Veränderung gegenüber der Stammverbindung.

In den fünf aus dem jeweiligen Naturstoff gewonnenen Verbindungen II, V, VI, VIII und IX wurde diese Doppelbindung entweder hydriert oder es wurde Ethanol addiert. Die Verbindungen zeigen alle eine Aktivitätssteigerung im Vergleich zur Ausgangsverbindung.

Im Azadirachtin A (I) und 22,23-Dihydroazadirachtin A (II) ist der Unterschied nicht allzu groß, bei den anderen Verbindungen dagegen statistisch signifikant. Die beiden Hydrierungsprodukte VIII und IX des Azadirachtins B (VII)

unterscheiden sich deutlicher von der Stammverbindung als das Hydrierungsprodukt des Azadirachtins A.

Insgesamt scheint die Furan-Doppelbindung nicht von entscheidender Bedeutung für die Azadirachtinwirkung zu sein. Diese ist sogar erhöht, wenn die Doppelbindung nicht vorhanden ist.

Tabelle 12. Azadirachtine mit Unterschieden im Furanteil

Substanz		MC ₅₀
Azadirachtin A	(I)	1,66
Azadirachtin B	(VII)	1,30
23 α -Ethoxy-22,23-dihydro-Aza A	(V)	0,74
23 β -Ethoxy-22,23-dihydro-Aza A	(VI)	0,52
22,23-Dihydroazadirachtin A	(II)	1,26
22,23-Dihydroazadirachtin B	(VIII)	0,28
Tetrahydroazadirachtin B	(IX)	0,48

Beim Ecdyson, einem potentiellen Antagonisten am gleichen Rezeptor, sind in der Seitenkette acht C-Atome des Steroidgrundgerüsts erhalten. Beim Azadirachtin sind in Form des Furanrings nur vier davon "erhalten". Das Fehlen weiterer C-Atome könnte die Aktivität negativ beeinflussen. Diese These wird durch die beiden Ethoxy-Derivate gestützt, bei denen an die Furan-Gruppe noch eine Kette mit 3 Atomen (O-C-C) angegliedert ist. Die Aktivität wird dadurch stärker erhöht, als es durch das Hydrieren der Doppelbindung der Fall ist.

5.3. Auswirkungen von Änderungen an C-11

Bei den in Tabelle 11 verglichenen sieben Verbindungen haben die Abkömmlinge von Azadirachtin B durchweg eine höhere Aktivität als die von Azadirachtin A. Das liegt wahrscheinlich an der unterschiedlichen Struktur an C-11. Es scheint wichtig zu sein, daß an dieser Position keine Gruppe mit großer Raumerfüllung steht.

Für die Betrachtung der Modifikationen an C-11 stehen besonders vier Verbindungen zur Verfügung (Tab.13):

Tabelle 13. Substanzen mit Veränderungen an C-11 des Azadirachtinmoleküls

Substanz		MC ₅₀ (ppm)
Azadirachtin A	(I)	1,66
Azadirachtin B	(VII)	1,30
11-Acetyl-Azadirachtin A	(III)	8,68
Azadirachtin F	(XV)	1,15

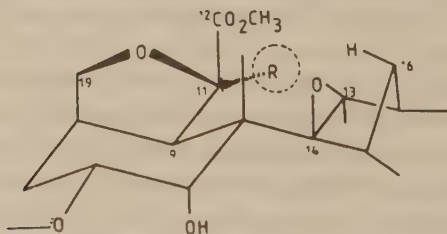


Abb.31. Sterische Hinderung der Epoxidfunktion durch Substitution an C-11 mit sterisch anspruchsvollen Gruppen

Azadirachtin F ist an C-1 und C-3 gleich substituiert wie Azadirachtin B. Die Azadirachtine A, B und F unterscheiden sich nur noch an C-11. Azadirachtin A besitzt dort eine Hydroxylgruppe, Azadirachtin B ein Proton. Bei diesen beiden Verbindungen ist die Methylenbrücke von C-19 zu C-11

vorhanden, bei Azadirachtin F fehlt sie und C-19 ist eine Methylgruppe. An C-11 steht sowohl ein Proton als auch eine Hydroxylgruppe. Die ganze Gruppe um C-11/C-12 ist frei drehbar. Dennoch wird durch diese Veränderungen die Aktivität nicht beeinflusst. Der aus Tabelle 12 entnehmbare Unterschied kann allein durch die unterschiedliche Substitution an C-1 bzw. C-3 erklärt werden. Die bei III erkennbare Aktivitätsminderung wird im nachfolgenden Abschnitt zu erklären versucht.

5.4. Auswirkung von Änderungen im Bereich C-13 - C-20

Dieser Bereich scheint entscheidend für die biologische Wirkung der Azadirachtine zu sein.

Nach den vorliegenden Ergebnissen könnten dort drei funktionelle Gruppen für die biologische Wirkung verantwortlich sein: .

1. Epoxid-Funktion an C-13/C-14
2. Ketalfunktion an C-21
3. freie Hydroxylgruppe an C-7

Von den siebzehn untersuchten Verbindungen haben dreizehn diese Funktionen im Molekül. Mit Ausnahme von 11-Acetylazadirachtin A haben alle eine MC_{50} zwischen 0,1 ppm und 2,8 ppm. Das ist ein enger Bereich, dessen Breite zudem noch durch die unterschiedliche Hydrolysegeschwindigkeit der beiden Ester an C-1 und C-3 erklärt werden könnte. Die herabgesetzte Aktivität beim 11-Acetylazadirachtin A läßt sich durch eine sterische Hinderung der Epoxidfunktion erklären.

Vier der siebzehn untersuchten Verbindungen unterscheiden sich vom Azadirachtin A durch das Fehlen eines Epoxidrings und haben eine deutlich geringere biologische Wirkung:

Tabelle 14. Substanzen mit Veränderungen an C-13 - C-20 des des Azadirachtinmoleküls

Substanz		MC ₅₀ (ppm)
23 α -Ethoxy-22,23-dihydro-13,14-deepoxy- 17-hydroxyazadirachtin B	(XI)	>100
Azadirachtin C	(XII)	12,97
Azadirachtin G	(XVI)	7,69
Salannin	(XVII)	>100

Azadirachtin G hat eine MC₅₀ von 7,7 ppm. In diesem Molekül sind die Hydroxylgruppe an C-7 und die Ketal-Funktion an C-21, nicht jedoch die Epoxid-Funktion vorhanden. Das deutet darauf hin, daß die Aktivität eines Azadirachtins nicht notwendigerweise unterbunden wird, wenn der Epoxid-Ring fehlt. Dem widerspricht allerdings die Beobachtung bei Substanz XI, welche in dem angesprochenen Bereich die gleichen funktionellen Gruppen wie das Azadirachtin G hat. Eine wachstumshemmende Wirkung dieser Substanz wurde aber nicht festgestellt. Eine Aussage, ob der Epoxid-Ring allein für die Wirkung verantwortlich ist, ist deshalb mit den vorliegenden Daten nicht möglich.

2.5. Zusammenfassung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Im Hinblick auf die vorstehend diskutierte Teilstrukturen und die Wirksamkeit entsprechender Verbindungen ergeben sich folgende Gesichtspunkte für die biologische Wirkung der Azadirachtine:

1. An C-1 und C-3 müssen Hydroxylgruppen vorhanden sein. Freie Hydroxylgruppen an diesen Stellen bedeuten eine hohe Aktivität.
2. Im richtigen Abstand zu den Hydroxylgruppen muß ein Epoxidring vorhanden sein. Mit nur einer Ausnahme war die Aktivität der Verbindungen herabgesetzt, bei denen der Epoxidring fehlte. Ein Einfluß der Hydroxylgruppe an C-7, sowie der Ketalfunktion an C-21 kann nicht ausgeschlossen werden.
3. Ein hydrierter Puranring oder eine Seitenkette im richtigen Abstand zum Epoxidring erhöht die Aktivität der Verbindung.

In dem folgenden Molekül sind diese Punkte verwirklicht:

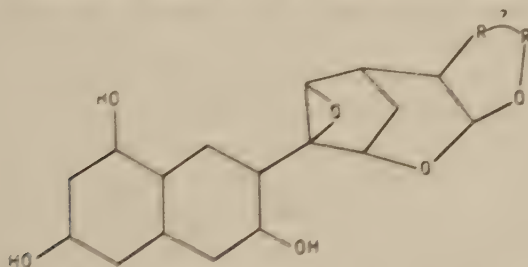


Abb. 32. Vorschlag eines Moleküls, das die wachstumshemmende Wirkung von Azadirachtin beinhalten könnte

Dieses Molekül (Abb.32) könnte die "minimale Wirkstruktur" eines Azadirachtins sein.

Eine Struktur-Recherche in den Chemical Abstracts, ob ein Molekül mit diesem Grundgerüst bekannt ist, führte zu keinem positiven Ergebnis. Die Suche ergab nur vier Substanzen, in denen dieses Fragment enthalten ist: es waren Zitate der Veröffentlichungen über die Struktur von Azadirachtin A und B^{61,62,73,76}. Dies ist eine gute Kontrolle für die Verlässlichkeit der durchgeführten Recherche.

5.6. Ausblick.

Die Synthese der "wesentlichen Strukturmerkmale" von Azadirachtin (Abb.32) erscheint schwierig. Die skizzierte Verbindung scheint in keinem Fall wirtschaftlich herstellbar zu sein. Sie sollte aber der Ausgangspunkt für weitere Struktur-Wirkungs-Studien sein.

Vermutlich ist es möglich, noch einfachere Strukturen zu entwerfen, die die biologische Aktivität von Azadirachtin tragen, und die preiswert synthetisiert werden können, um dann Eingang in eine effiziente Schädlingsbekämpfung auf biologischer Basis zu finden.

IV. Zusammenfassung

Der Neembaum enthält viele Substanzen, die auf Insekten fraß- und/oder metamorphosehemmend wirken. Einige dieser Substanzen waren bereits isoliert und ihre Struktur aufgeklärt. Der bei Beginn der vorliegenden Arbeit bekannte wirksamste Neem-Inhaltsstoff war das Azadirachtin, dessen Struktur erst 1985 endgültig aufgeklärt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden aus Neem-Nüssen sieben Azadirachtine (A - G) isoliert. Die Hauptkomponente ist identisch mit Azadirachtin A. Die Struktur einer zweiten Hauptkomponente, Azadirachtin B, wurde in der vorliegenden Arbeit, parallel zur Arbeitsgruppe um W.Kraus, ermittelt und publiziert. Die Strukturen von fünf weiteren Azadirachtinen (C - G) werden erstmals beschrieben, wobei von Azadirachtin C nur eine Teilstruktur ermittelt werden konnte.

Azadirachtin B unterscheidet sich von Azadirachtin A in drei Punkten: an C-3 steht ein Tiglinsäureester, an C-1 eine Hydroxylgruppe, die Hydroxylgruppe an C-11 ist durch ein Proton ersetzt. Azadirachtin D trägt an C-4 eine Methylgruppe statt eines Methylesters. Die Substanz ist im übrigen identisch mit Azadirachtin A. Azadirachtin E ist das natürliche Detigloylderivat von Azadirachtin A. Azadirachtin F leitet sich von Azadirachtin B ab. Die Sauerstoffbrücke an C-11/C-19 ist geöffnet, an C-11 steht eine Hydroxyl-, an C-19 eine Methylgruppe. Azadirachtin G ist ein Isomeres von Azadirachtin B. An C-13/C-14 ist eine Doppelbindung statt der Epoxidfunktion, an C-17 ist eine Hydroxylgruppe anstelle eines Protons.

Die Azadirachtine zeigen im biologischen Test an E. varivestis verschiedene Wirkungen. Der Test wurde so durchgeführt, daß eine quantitative Aussage über die hier interessierende metamorphosehemmende Wirkung möglich war. Dazu mußte vorher eine Trennung von der überlagernden

fraßhemmenden Wirkung erzielt werden. Es stellte sich heraus, daß die fraßhemmende Wirkung erst bei einer etwa zehnmal so hohen Wirkstoffkonzentration auftritt wie die metamorphosestörende. Dies wurde für alle hier isolierten Azadirachtine gefunden. Bezüglich der metamorphosestörenden Wirkung stellte sich heraus, daß die Hauptkomponente, Azadirachtin A, nicht die biologisch aktivste Verbindung dieser Gruppe ist. Die Azadirachtine D und F zeigen eine deutlich höhere Hemmwirkung.

Ein Vergleich der Strukturen mit ihren biologischen Aktivitäten sollte es ermöglichen, jene Strukturelemente zu erkennen, die für die Wirkung wesentlich sind. Um die für die Wirkung wichtigen Strukturelemente zu erfassen, wurden die biologischen Aktivitäten der Substanzen, ausgedrückt in Metamorphose-störender Konzentration bei 50% der Tiere (MC_{50}), mit ihren jeweiligen Strukturen verglichen. Zusätzlich wurden hierzu einige Derivate von Azadirachtin A und B hergestellt, damit mehr Verbindungen zum Vergleich herangezogen werden konnten.

Bei diesen Vergleichen zeigte sich, daß in der Azadirachtin-Struktur einmal der Epoxidring wesentlich für die Wirkung ist. Bereits eine sterische Hinderung der Epoxidfunktion senkt die Wirkung. Ein fördernder Einfluß der benachbart stehenden Hydroxylgruppe an C-7 und der Ketalgruppe C-21 ist wahrscheinlich. Eine Derivatisierung der Dihydrofuranfunktion erhöht die Wirkung. Eine weitere Aktivitätssteigerung wurde festgestellt, wenn die Hydroxylgruppen an C-1 und C-3 frei sind.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein hypothetisches Molekülmodell entwickelt, das die wesentlichen Strukturmerkmale enthält und das der Ausgangspunkt für weitere Struktur-Wirkungs-Studien sein könnte, die letztlich zur Entwicklung eines der Synthese leichter zugänglichen "biologischen Insektizids" führen könnte.

V. Literatur

1. H.Rembold, Trans. Bose Res. Inst. 43, 53 (1980)
2. R.M.Chopra, Indigenous Drugs of India, 1958
Dhur Kalkutta, 2nd Ed., S.360
3. J.M.Watt, M.G.Breyer-Brankwijk, The medicinal and
poisonous plants of southern and eastern Africa, 1962
E.u.S. Livingstone, Edinburgh & London, 2nd Ed. ,S.745
4. J.S.Fry & Sons
Gold coast farmer 6, No. 10, 190 (1938)
5. H.Martin, The Scientific Principles of Crop Protection,
6th ed. Arnold, London 1973, S.179
6. D.G.Crosby in "Naturally occurring insecticides"
ed. M.Jacobson, Dekker, New York, 1971, S.177
7. C.R.Mitra, Neem, 1963, Central Oilseeds Committee
Hyderabad-29
8. W.Kraus, R.Cramer
Chem. Ber. 114, 2375 (1981)
9. J.Luecke, S.Fuchs, W.Voelter
Planta Med. 39, 280 (1980)
10. W.Kraus, R.Cramer, G.Sawitzki
Phytochem. 20, 117 (1981)
11. W.Kraus, R.Cramer
Tetrahedron Lett., 1978, 2395

12. S.Siddiqui, T.N.Waheed, J.Luecke, W.Voelter
Z. Naturforsch. 30B, 961 (1975)
13. C.R.Mitra, H.S.Garg, G.N.Pandey
Phytochem. 10, 857 (1971)
14. W. Kraus in "New Trends in Natural Products
Chemistry 1986", Atta-ur-Rahman, P.W. LeQuesne eds.,
1986, S.237
15. C.Devakumar, S.K.Mukerjee
Ind. J. Chem., Sect. B 24, 1105 (1985)
16. A.Bruhn, M.Bokel, W.Kraus
Tetrahedron Lett. 25, 3691 (1984)
17. S.Siddiqui, B.S.Siddiqui, S.Faizi
Planta Med.(1985) 478
18. G.Podder, S.B.Mahato
Heterocycles 23, 2321 (1985)
19. S.Siddiqui, B.S.Siddiqui, S.Faizi, T.Mahmood
Phytochem. 23, 2899 (1984)
20. D.Lavie, E.C.Levy, M.K.Jain
Tetrahedron 27, 3927 (1971)
21. H.C.Sharma, K.Leuschner, A.V.B.Sankaram, D.Gunasekhar,
M.Marthandamurthi, K.Bhaskariah, M.Subramanyam,
N.Sultana in "Natural pesticides from the Neem tree and
other tropical plants", H.Schmutterer, K.R.S. Ascher
eds.,GTZ, Eschborn,1981, S.291

22. W.Kraus, R.Cramer
Liebig's Ann. Chem. 1981, 181
23. M.Nakatani, H.Takao, I.Miura, T.Hase
Phytochem.24, 1945 (1985)
24. P.Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 10.Aufl., 1977, S. 342
25. P.Karlson in "Natural products and the protection of
plants", G.B.Martini-Bettolo,ed.,
Elsevier, Amsterdam,1977, S.20
26. G.B.Staal in "Natural products and the protection of
plants", G.B. Martini-Bettolo,ed.,
Elsevier, Amsterdam,1977, S.355
27. B. Krishnamurti, D.S.Rao
Bull. agric. Coll. Res. Inst. Magore 14, 1 (1950)
28. J.H. Butterworth, E.D. Morgan
Chem. Commun. 1968,23-24
29. J.H.Butterworth, E.D. Morgan
J. Insect Physiol. 17, 969 (1971)
30. J.S. Gill, C.T.Lewis
Nature 232, 402 (1971)
31. J.Meisner, B.K.Mitchell
Z.PflKrankh PflSch 89, 463 (1982)
32. J.Meisner, K.R.S.Ascher, R.Aly, J.D.Warthen jr.
Phytoparasitica 9, 27 (1981)
33. R.Steets, H.Schmutterer
Z.PflKrankh PflSch 82, 176 (1975)

34. H.Rembold, G.K.Sharma, Ch.Czoppelt, H.Schmutterer
Z. angew. Entomol. 93, 12 (1982)
35. G.K.Sharma, Ch.Czoppelt, H.Rembold
Z. angew. Entomol. 90, 439 (1980)
36. H.Rembold, G.K.Sharma, Ch.Czoppelt in
"Natural pesticides from the Neem tree",
H.Schmutterer, K.R.S.Ascher, H.Rembold eds.,
GTZ, Eschborn, 1981, S.121
37. I.Kubo, J.A.Klocke
Agric. Biol. Chem. 46, 1951 (1982)
38. I. Kubo, J.A.Klocke, S.Asano
Agric. Biol. Chem. 45, 1925 (1981)
39. H.Rembold, K.P.Sieber in
"Natural pesticides from the Neem tree",
H.Schmutterer, K.R.S.Ascher, H.Rembold eds.,
GTZ, Eschborn, 1981, S.75
40. H.Rembold, K.P.Sieber
Z. Naturforsch. 36c, 466 (1981)
41. K.P.Sieber, H.Rembold
J. Insect Physiol. 29, 523 (1983)
42. G.T.Gujar, K.N.Mehrota
Indian J. Exp. Biol. 21, 292 (1983)
43. S.Quadri, J.Narsaiah
Indian J. Exp. Biol. 16, 1141 (1978)
44. O.Koul, Z. angew. Entomol. 98, 221 (1984)
45. O.Koul, Entomol. exp. appl. 36, 85 (1984)

46. E.S.Garcia, H.Rembold
J. Insect Physiol. 30, 939 (1984)
47. E.S.Garcia, P. de Azambuja, H.Forster, H.Rembold
Z. Naturforsch. 39c, 1155 (1984)
48. T.L.Ladd jr., J.D.Warthen jr., M.G.Klein
J. Econ. Entomol. 77, 903 (1984)
49. T.L.Ladd jr. in "Natural pesticides from the Neem tree
and other tropical plants", H.Schmutterer,
K.R.S.Ascher eds., GTZ, Eschborn, 1984, S.425
50. S.F.Chiu, X.Zhang, S.K.Liu, D.P.Huang
Acta Entomol. Sin. 27, 241 (1984)
51. I.A.Gaaboub, D.K.Hayes
Environ. Entomol. 13, 803 (1984)
52. I.A.Gaboub, D.K.Hayes
Environ. Entomol. 13, 1639 (1984)
53. J.T.Arnason, B.J.R.Philogene, N.Donkov, M.Hudon,
C.McDougall, G.Fortier, P.Morand, D.Gardner, J.Lambert,
C.Morris, C.Nozzolillo
Entomol. exp. appl. 38, 29 (1985)
54. O.Koul
Ind. J. exp.Biol. 23, 160 (1985)
55. S.Chiu, Z.Xing, L.Siuking, H.Duanping
Z. angew. Entomol. 99, 276 (1985)
56. A.J.Mordue, P.K.Cottee, K.A.Evans
Physiol. Entomol. 10, 431 (1985)

57. U.Schlüter, H.J.Bidmon, S.Grewe
J. Insect Physiol. 31, 773 (1985)
58. A.Dorn, J.M.Rademacher, E.Sehn,
J. Insect Physiol. 32, 231 (1986)
59. U.Schlüter, Entomol. Exp. Appl. 39,191 (1985)
60. P.R.Zanno, I.Miura, K.Nakanishi, D.L.Elder
J. Amer. Chem. Soc. 97, 1975 (1975)
61. W.Kraus, M.Bokel, A.Klenk, H.Pöhl
Tetrahedron Lett. 26, 6435 (1985)
62. H.B.Broughton, S.V.Ley, A.M.Z.Slawin, D.J.Williams,
E.D.Morgan
Chem. Commun.(1986), 46
63. K.Nakanishi
Rec. Adv. Phytochem. 9, 283 (1975)
64. J.H.Butterworth, E.D.Morgan, G.R.Percy
J. Chem. Soc. Perkin Trans I,(1972) 2445
65. H.Rembold, G.K.Sharma, C.Czoppelt, H.Schmutterer
Z.PflKrankh PflSch, 87, 290 (1980)
66. J. Jeener, Ampere International Summer School,
Basko Polje, Yug., 1971
67. A.Kumar, G.Wagner, R.R.Ernst, K.Wüthrich
Biochem. Biophys. Res. Comm. 96, 1156 (1980)

68. J.Jeener, B.H.Meier, P.Bachmann, R.R.Ernst
J. Chem. Phys. 71, 4546 (1979)
69. D.L.Turner, J. Magn. Res. 61, 28 (1985)
70. M.R.Bendall, D.M.Doddrell, D.T.Pegg
J. Magn. Reson. 44, 238 (1981)
71. J.N.Bilton, H.B.Broughton, S.V.Ley, Z.Lidert,
E.D.Morgan, H.S.Rzepa, R.N.Sheppard
Chem. Commun.,(1985) 968
72. H.Rembold, J.Forster, J.Sonnenbichler
Z.Naturforsch., 42c, 4-6, (1987)
73. A.Klenk, M.Bokel, W.Kraus
Chem.Comm.,(1986) 523
74. H.Rembold, H.Forster, Ch.Czoppelt, P.J.Rao, K.P.Sieber
in "Natural pesticides from the Neem tree and other
tropical plants", H.Schmutterer, K.R.S. Ascher eds.,
GTZ, Eschborn,1984, S.153
75. I.Kubo, T.Matsumoto, A.Matsumoto, J.N.Schoolery
Tetrahedron Lett. 25, 4729 (1984)
76. I.Kubo, A.Matsumoto, T.Matsumoto, J.A.Klocke
Tetrahedron 42, 489 (1986)
77. R. Henderson, R. McCrindle, A.Melera, K.H. Overton
Tetrahedron 24, 1225 (1968)

78. M.Harris, R.Henderson, R. McCrindle, K.H. Overton
D.W. Turner
Tetrahedron 24, 1517 (1968)
79. O.Korver, M. van Gorkom
Tetrahedron 30, 4041 (1974)
80. S.Siddiqui, S.Faizi, B.S.Siddiqui
Z.Naturforsch. 41b, 922 (1986)
81. Agricultural Insect Pests of the Tropics and
their control, ed. Dennis S. Hill
Cambridge University Press, S. 362, 1975
82. S.Noack, C.Reichmuth
Mitt. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstwirtsch.
Heft 185, August 1978
83. G.Gottschalk, Einführung in die chemischen Grundlagen
der Materialprüfung, S.Hirzel Verlag (1966)
84. R.Bergamasco, D.H.S. Horn in "Progress in Ecdysone
Research", J.A. Hoffmann ed., Elsevier Amsterdam,
S.299

VI. Anhang

Abb. A1. ^1H -NMR-Spektrum von Azadirachtin A mit Zuordnung der Protonen nach Tabelle A1.

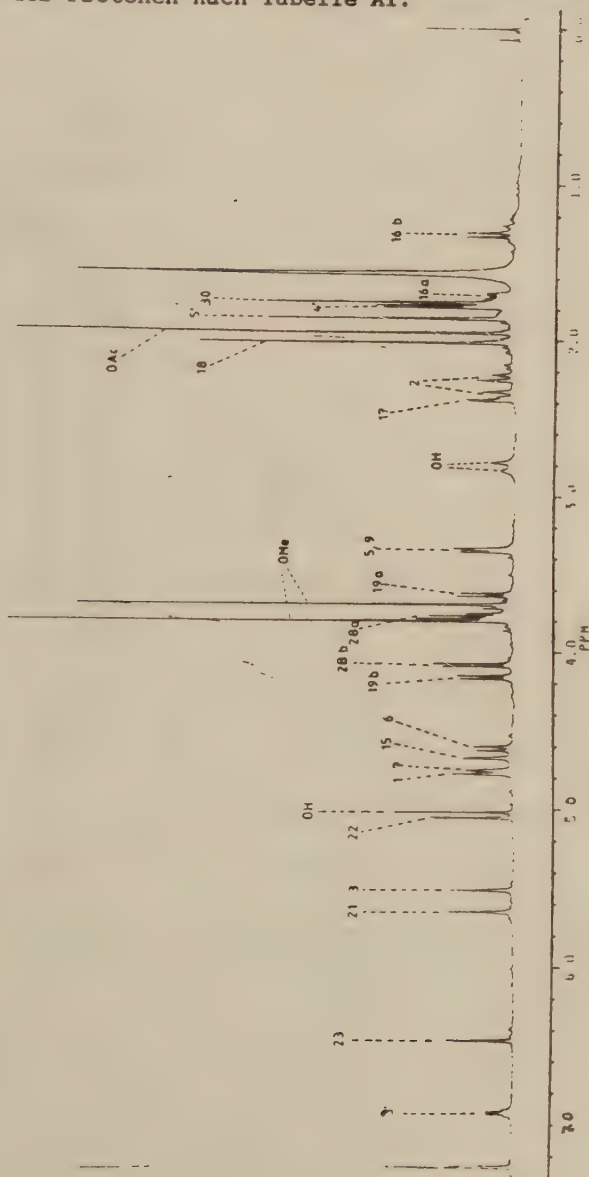


Abb.A2. COSY von Azadirachtin A

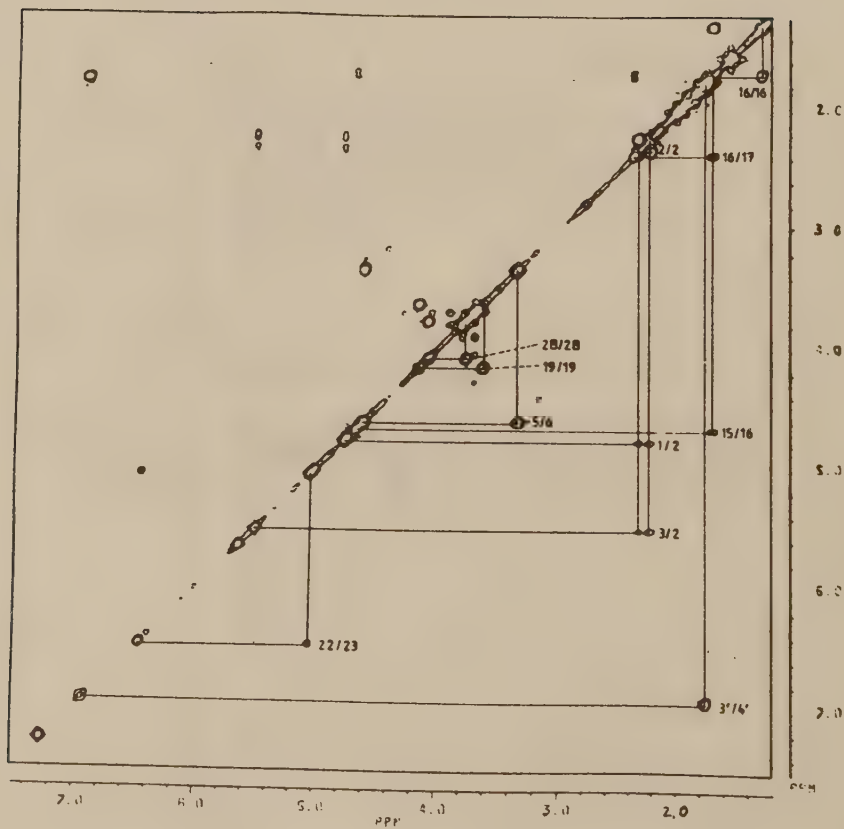


Tabelle A1: ^1H - und ^{13}C -Resonanzen von Azadirachtin A

C-Atom	^{13}C -Res. (ppm)	M	^1H -Res. (ppm)	M	J (Hz)
1	70,60	d	4,77	t	2,7
2	29,82	t	2,24	d/t	17,0/2,7
			2,34	d/t	17,0/2,7
3	67,04	d	5,51	t	2,7
4	52,52	s			
5	37,12	d	3,35	d	12,7
6	73,82	d	4,61	dd	12,7/2,6
7	74,43	d	4,75	d	2,6
8	45,50	s			
9	44,77	d	3,34	s	
10	50,25	s			
11	104,20	s			
12	171,77	s			
13	68,59	s			
14	70,02	s			
15	76,49	d	4,67	d	3,4
16	25,07	t	1,71	ddd	13.1/3,4/5,3
			1,32	d	13,1
17	48,71	d	2,38	d	5,3
18	18,43	q	2,01	s	
19	69,13	t	3,63	d	9,7
			4,16	d	9,7
20	83,57	s			
21	108,80	d	5,65	s	
22	107,44	d	5,05	d	2,7
23	147,06	d	6,46	d	2,7
28	73,02	t	3,77	d	9,0
			4,08	d	9,0
29	173,33	s			
30	21,38	q	1,75	s	

(Fortsetzung von Tabelle A1)

C-Atom	¹³ C-Res. (ppm)	M	¹ H-Res. (ppm)	M	J (Hz)
OCH ₃	52,72	q	3,69	s	
OCH ₃	53,26	q	3,80	s	
Acetyl:					
CO ₂	169,59	s			
CH ₃	20,89	q	1,95	s	
Tigloyl:					
1'	166,22	s			
2'	128,69	s			
3'	137,54	d	6,93	q	7,0
4'	14,30	q	1,78	d	7,0
5'	11,97	q	1,86	s	
OH			2,85		
OH			2,75		
OH			5,03		

Abb.A3. Eindimensionales ^1H -NMR-Spektrum von Azadirachtin B

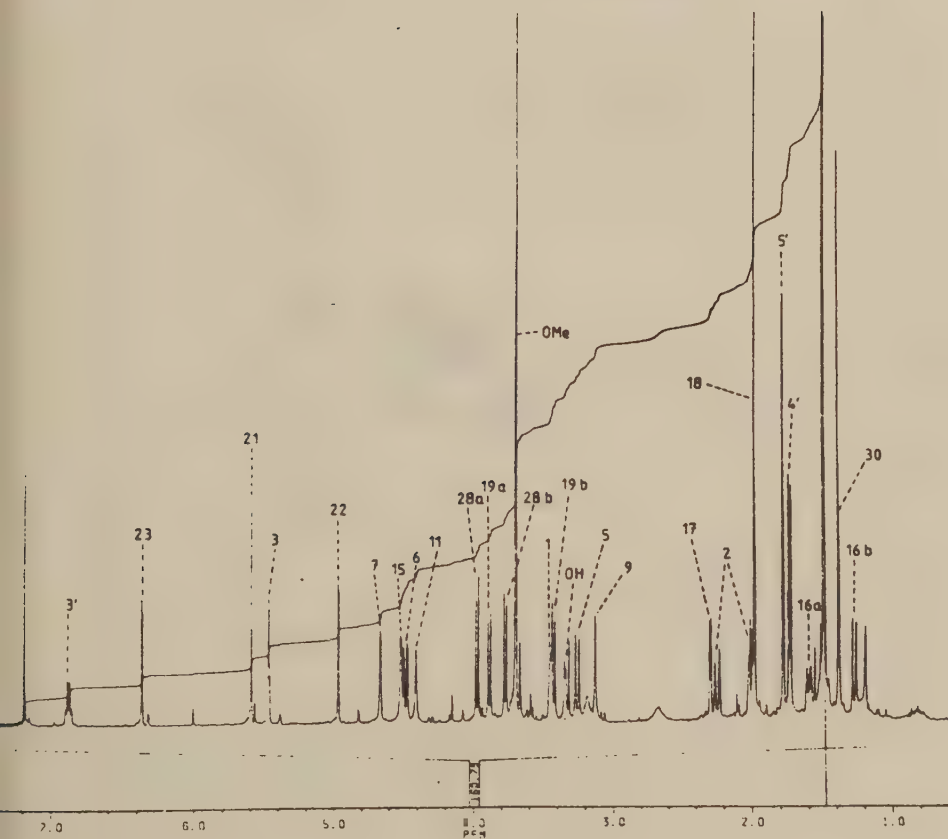


Abb.A4. COSY von Azadirachtin B

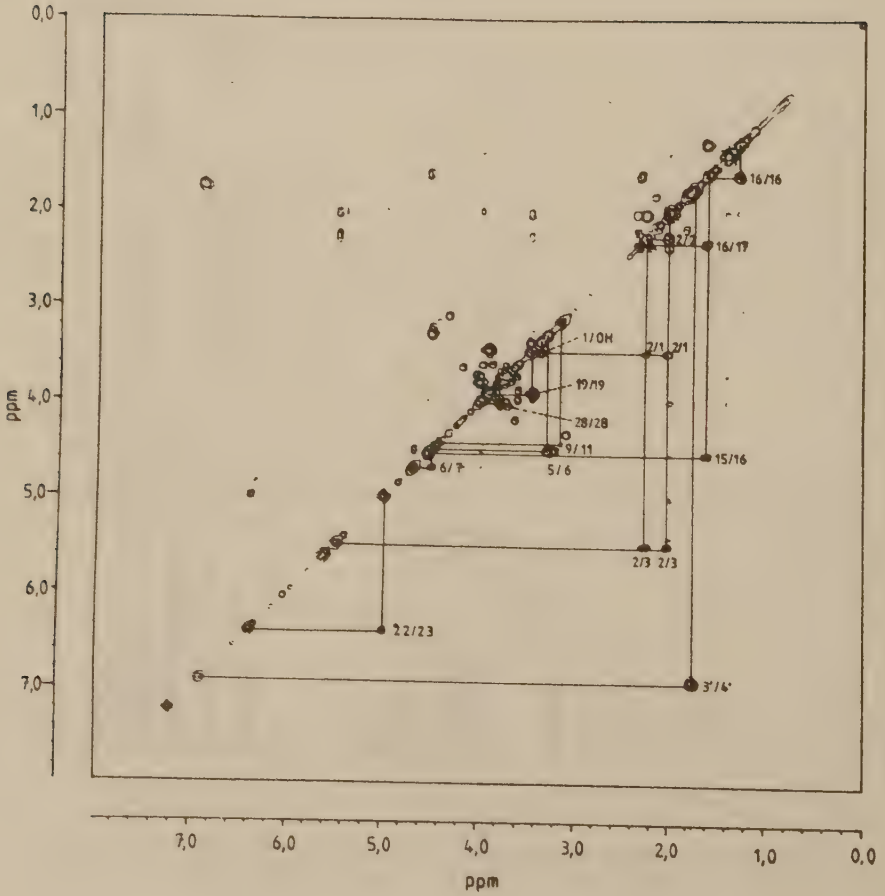


Abb.A5. ^1H -NMR-Spektrum von Azadirachtin C. Die Zahlen bezeichnen die zugeordneten Protonen

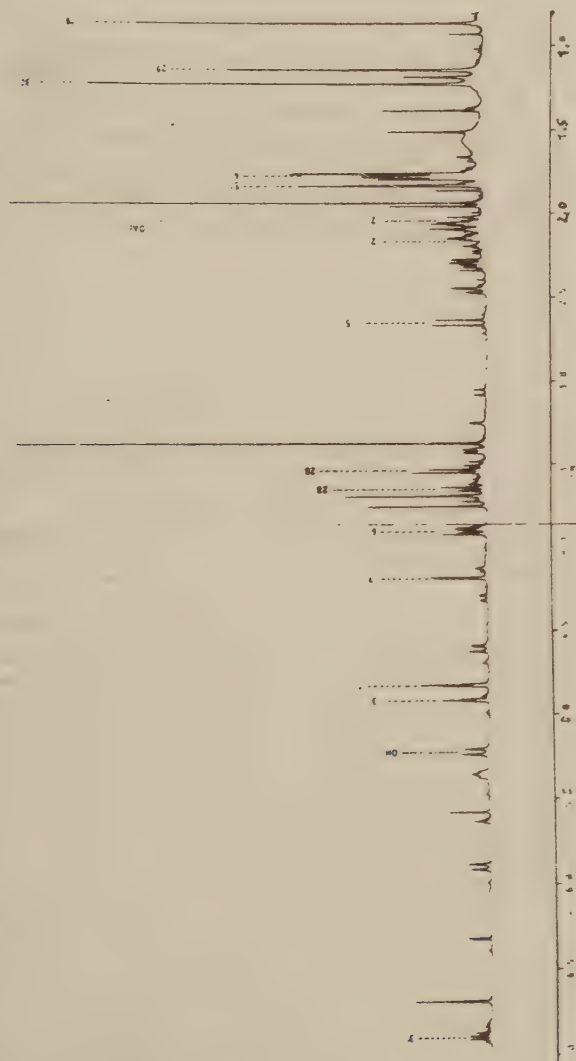


Abb.A6. ^1H -NMR-Spektrum von Azadirachtin D. Die Bezeichnung der Signale erfolgte nach Tabelle 4



Abb.A7. ^1H -NMR-Spektrum von Azadirachtin E. Die Bezeichnung der Signale erfolgte nach Tabelle 5

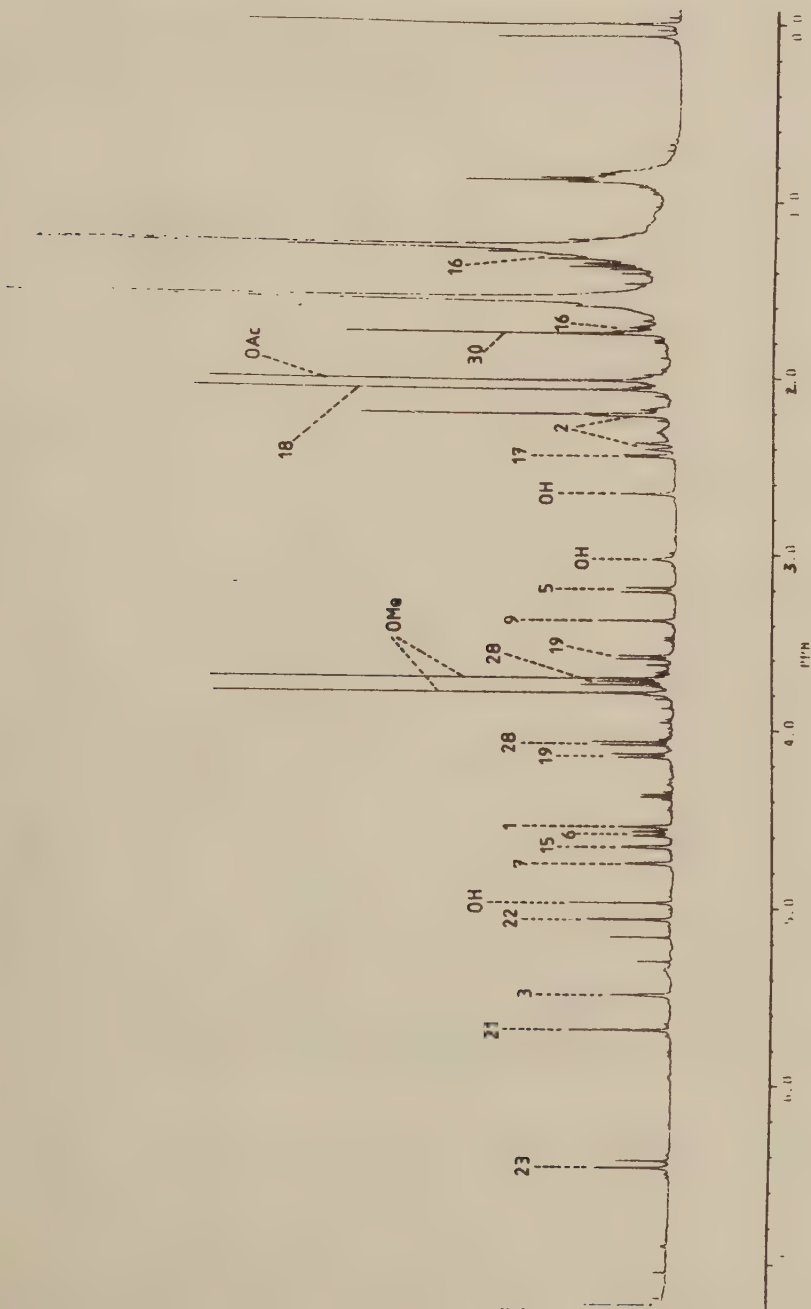


Abb.A8. ^1H -NMR-Spektrum von Azadirachtin F. Die Bezeichnung der Signale erfolgte nach Tabelle 6

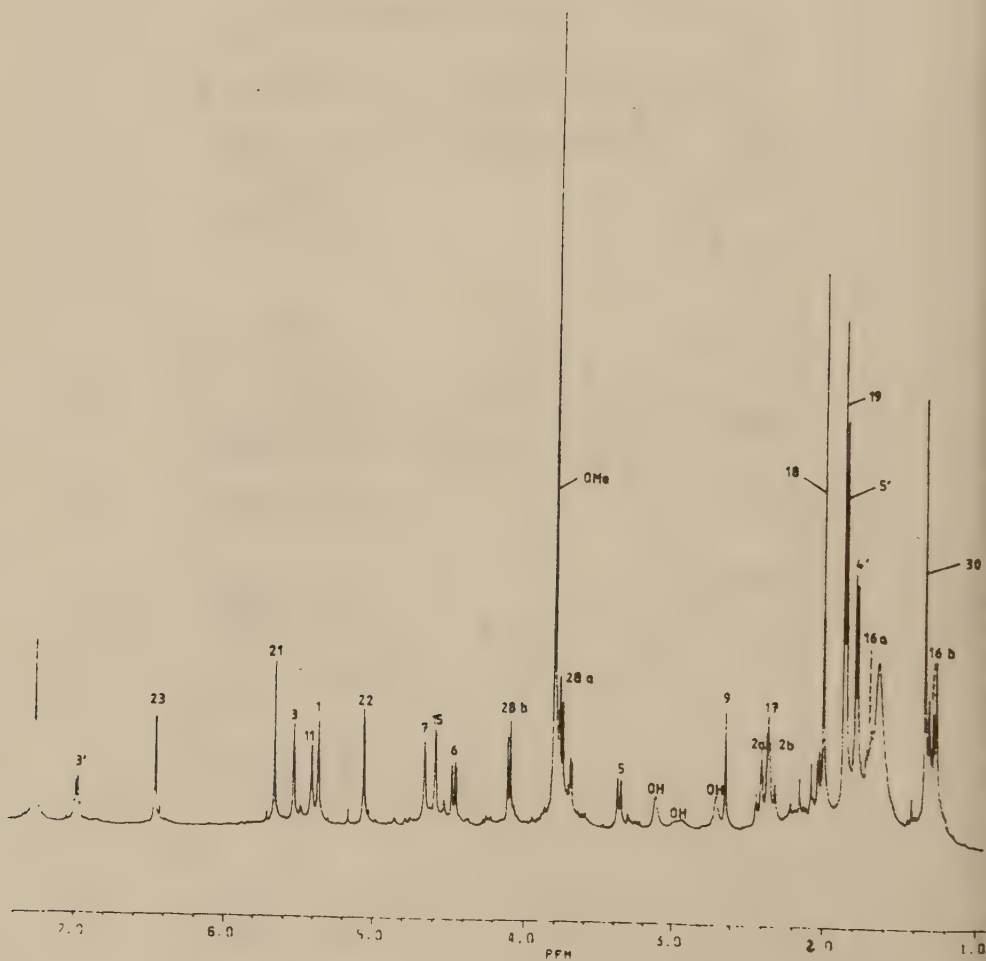


Abb. A9. 2-D-COSY von Azadlactatin F

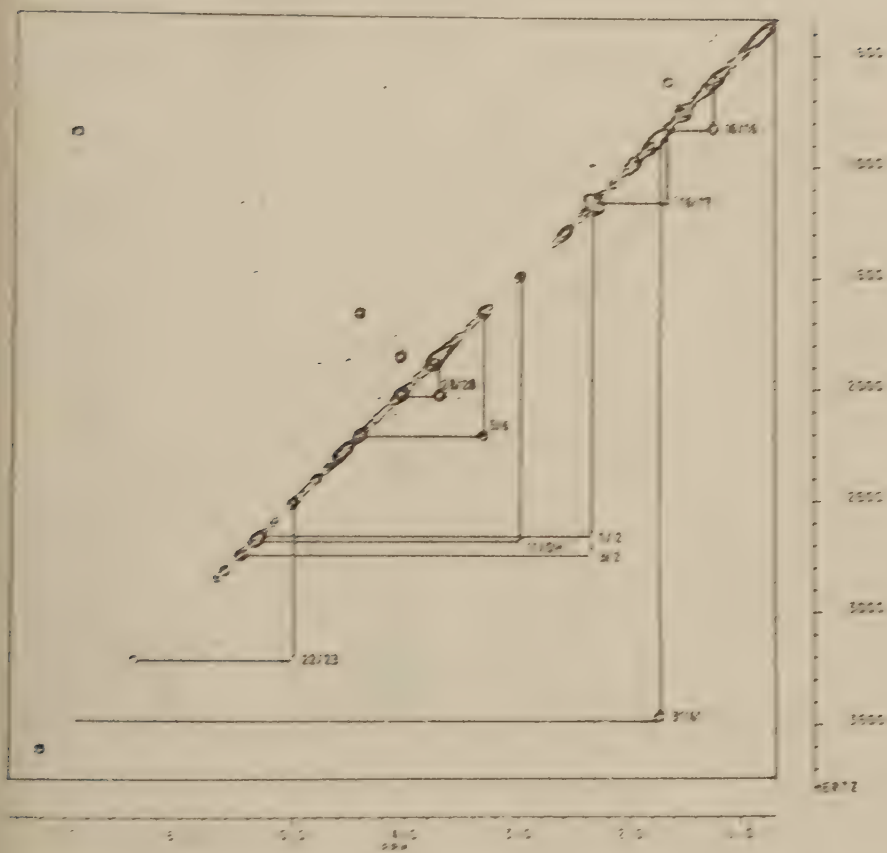


Abb.A10. ^1H -NMR-Spektrum von Azadirachtin G. Die Bezeichnung der Signale erfolgte nach Tabelle 7

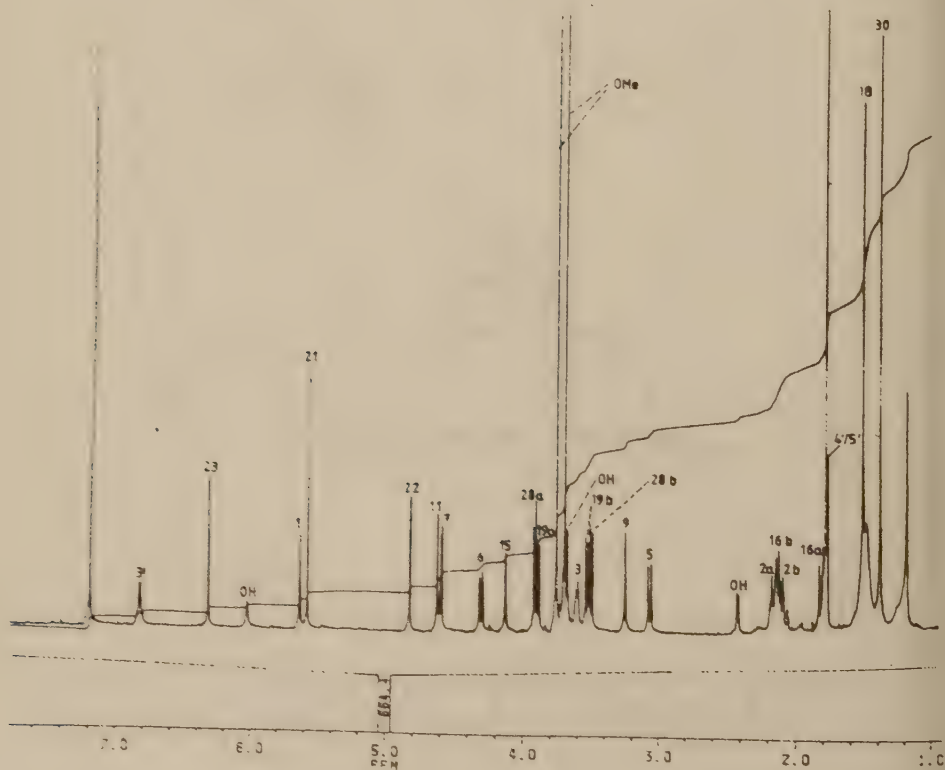


Abb.A11. 2-D-COSY von Azadirachtin G. In der unteren Hälfte sind die nach Tabelle 18 zugeordneten Protonen eingezeichnet. Die obere Hälfte zeigt das originale Spektrum

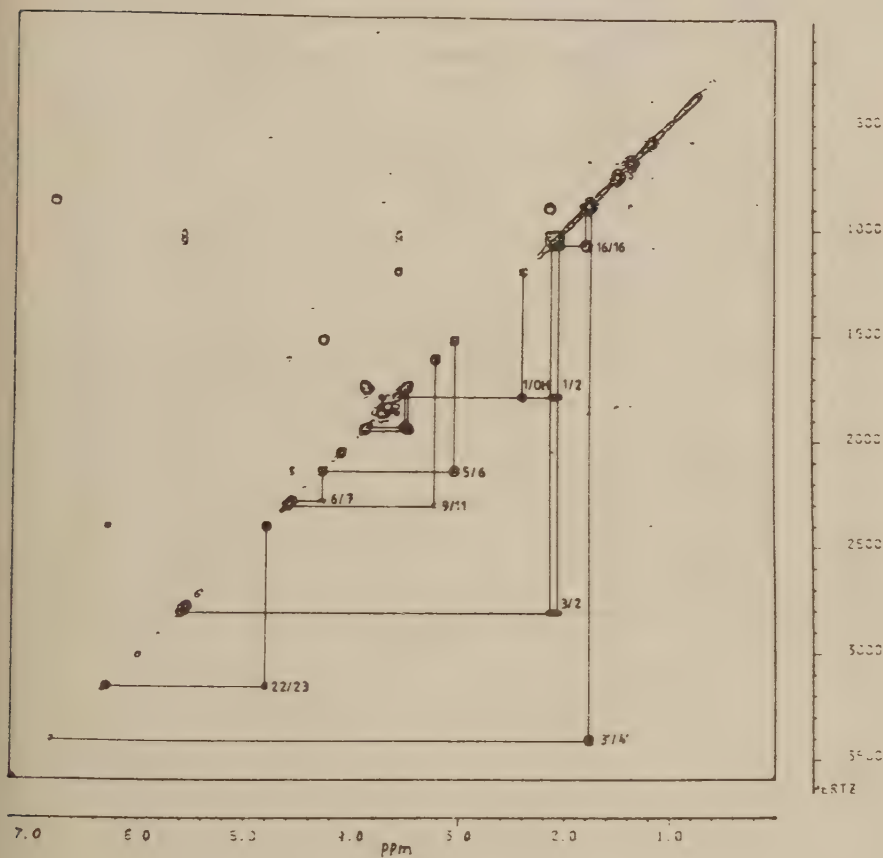


Tabelle A2: Protonen von 22,23-Dihydroazadirachtin A

Proton	^1H -Res. M, J (ppm) (Hz)	Proton	^1H -Res. M, J (ppm) (Hz)
1	4,7 (t, 2,5)	23a	3,98 (td; 4,7; 8,3)
2a	2,28 (dt, 16,9; 2,5)	23b	3,87 (td; 7,8; 9,0)
2b	2,19 (dt, 16,9; 2,5)	28a	4,03 (d; 8,9)
3	5,43 (t, 2,5)	28b	3,70 (d; 8,9)
5	3,24 (d, 12,5)	30	1,71 (s)
6	4,54 (dd, 12,5; 2,7)	OMe	3,75 (s)
7	4,68 (d, 2,7)	OMe	3,64 (s)
9	3,27 (s)	OAc	1,91 (s)
15	4,63 (d; 3,5)		
16a	1,67 (ddd; 12,8; 3,5; 5,2)		
16b	1,49 (d; 12,8)	Tigloyl:	
17	2,43 (d; 5,2)	3'	6,85 (q; 7,0)
18	1,97 (s)	4'	1,74 (d; 7,0)
19a	4,11 (d, 9,7)	5'	1,81 (s _{br})
19b	3,58 (d; 9,7)		
21	5,24 (s)	OH:	3,19; 5,03; 2,80
22a	2,12 (m)		
22b	1,98 (m)		

Tabelle A3. Zuordnung der Resonanzsignale des
 ^{13}C -NMR-Spektrums von
 22,23-Dihydroazadirachtin B

C-Atom	^{13}C -Res. (ppm)	C-Atom	^{13}C -Res. (ppm)
1	67,6	18	18,2
2	32,0	19	71,3
3	69,2	20	81,1
4	53,2	21	107,6
5	35,2	22	41,1
6	74,3	23	64,8
7	73,5	28	73,2
8	43,9	29	173,3
9	43,7	30	21,2
10	51,1	OMe	52,5
11	79,4	OMe	52,8
12	174,0	Tigloyl:	
13	66,3	1'	166,5
14	69,1	2'	128,0
15	76,4	3'	139,6
16	24,2	4'	14,5
17	50,4	5'	12,2

Tabelle A4. Signale des ^1H -NMR Spektrums von 3-Dehtigloyl-
3-(2-methylbutyryl)-22,23-dihydro-azadirachtin B

Proton	^1H -Res. (ppm)	M, J (Hz)	Proton	^1H -Res. (ppm)	M, J (Hz)
1	3,42	(m)	22a	2,34	(m)
2a	2,25	(dq, 16,2; 2,5)	22b	2,10	(m)
2b	1,96	(verdeckt)	23a	3,94	(ddd, 4; 8,5; 7,5)
3	5,36	(q, 2,5)	23b	3,81	(m)
5	3,15	(d, 12,4)	28a	3,96	(d, 8,9)
6	4,47	(dd, 12,4; 2,8)	28b	3,82	(d, 8,9)
7	4,65	(d, 2,8)	30	1,36	(s)
9	3,07	(d, <1)	OMe	3,70	(s)
11	4,38	(d, <1)	OMe	3,69	(s)
15	4,51	(d, 3,5)	Dihydrotigloyl:		
16a	1,57	(ddd, 12,8; 5; 2,8)	2'	2,34	(m)
16b	1,50	(d, 12,8)	3'	1,65	(m)
17	2,38	(d, 5,0)	4'	0,86	(t, 7,4)
18	1,97	(s)	5'	1,10	(dd, 7,0; 1,0)
19a	3,85	(d, 9,4)	OH:		
19b	3,40	(d, 9,4)	3,28; 3,25; 2,56		
21	5,16	(s)			

Tabelle A5. Protonen von 11-Acetylazadirachtin A

Proton	¹ H-Res. M;J (ppm) (Hz)	Proton	¹ H-Res. M;J (ppm) (Hz)
1	5,18 (t;2,5)	22	5,04 (d;2,9)
2a	2,28 (dt;17,1;2,5)	23	6,46 (d;2,9)
2b	2,19 (dt;17,1;2,5)	28a	4,07 (d;8,9)
3	5,49 (t, 2,5)	28b	3,75 (d;8,9)
5	3,36 (d;12,5)	30	1,75 (s)
6	4,62 (dd;12,5;2,3)	OMe	3,79 (s)
7	4,70 (d;2,3)	OMe	3,69 (s)
9	3,19 (s)	OAc	1,94 (s)
15	4,66 (d;3,5)	OAc	1,89 (s)
16a	verdeckt		
16b	1,33 (d;12,9)	Tigloyl:	
17	2,33 (d;5,5)	3'	6,86 (q;7,0)
18	2,05 (s)	4'	1,74 (d;7,0)
19a	4,26 (d;9,7)	5'	1,82 (s _{br})
19b	3,80 (d;9,7)		
21	5,61 (s)	OH:	3,1; 2,9

Tabelle A6. Protonen von 3-Deacetylazadirachtin A

Proton	¹ H-Res. M;J (ppm) (Hz)	Proton	¹ H-Res. M;J (ppm) (Hz)
1	4,85 (t;2,0)	22	5,05 (d;2,8)
2a	2,25 (dt;16,6;2,0)	23	6,45 (d;2,8)
2b	2,17 (dt;16,6;2,0)	28a	4,07 (d;8,4)
3	4,38 (m)	28b	4,26 (d;8,4)
5	3,25 (d;12,3)	30	1,76 (s)
6	4,61 (dd;12,3;2,7)	OMe	3,77 (s)
7	4,75 (d;2,7)	OMe	3,69 (s)
9	3,30 (s)		
15	4,66 (d;3,3)	Tigloyl:	
16a	1,71 (ddd;17,1;3,3;5,4)		
16b	1,31 (d;13,1)	3'	6,93 (q;7,0)
17	2,38 (d;5,4)	4'	1,79 (d;7,0)
18	2,02 (s)	5'	1,85 (s)
19a	4,23 (d;9,7)		
19b	3,61 (d;9,7)	OH: 3,0; 5,03; 2,8; 2,15	
21	5,67 (s)		

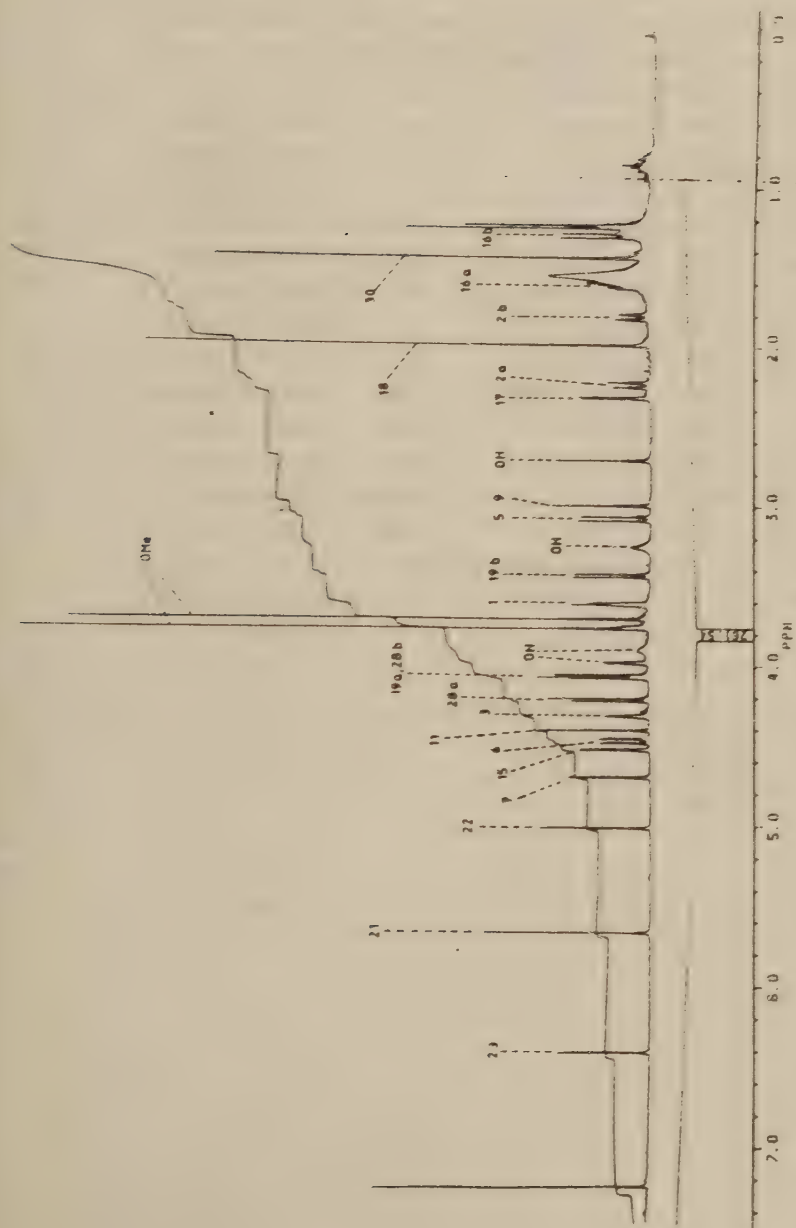
Abb.A12. ^1H -NMR-Spektrum von 3-Dehtigloylazadirachtin B

Tabelle A7. Zuordnung der Signale des ^1H -NMR-Spektrums
von 3-Detigloylazadirachtin B

Proton	^1H -Res.	M, J	Proton	^1H -Res.	M, J
	(ppm)	(Hz)		(ppm)	(Hz)
1	3,61	(dt, 5,5;3,0)	19a	4,07	(d, 9,8)
2a	2,25	(dt, 15,6;3,0)	19b	3,43	(d, 9,8)
2b	1,81	(dt, 15,6;3,0)	21	5,66	(s)
3	4,31	(s _{br})	22	5,01	(d, 2,9)
5	3,07	(d, 12,5)	23	6,40	(d, 2,9)
6	4,47	(dd, 12,5;2,6)	28a	4,21	(d, 8,6)
7	4,69	(d, 2,6)	28b	4,06	(d, 8,6)
9	2,99	(d, <1)	30	1,44	(d, 8,6)
11	4,40	(d, <1)	OMe	3,76	(s)
15	4,52	(d, 3,6)	OMe	3,70	(s)
16a	1,61	(ddd, 13,1;5,2;3,6)			
16b	1,30	(d, 13,1)	OH: 3,85(1), 3,98(3)		
17	2,23	(d, 5,2)	3,25, 2,71		
18	1,99	(s)			

Tabelle A8. NMR-Spektrum der Protonen von 23 α -Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A und von 23 β -Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A

Proton	23 α -Ethoxy-Derivat		23 β -Ethoxy-Derivat	
	^1H -Res. M, J (ppm)	(Hz)	^1H -Res. M, J (ppm)	(Hz)
1	4,74	(t; 2,4)	4,72	(t; 2,8)
2a	2,31	(dt; 17,0; 2,4)	2,29	(dt; 14,2; 2,8)
2b	2,20	(dt; 17,0; 2,4)	2,19	
3	5,48	(t; 2,4)	5,47	(t; 2,8)
5	3,37	(d; 12,5)	3,21	(d; 12,5)
6	4,58	(dd; 12,5; 2,5)	4,56	(dd; 12,5; 2,7)
7	4,66	(d; 2,5)	4,67	(d; 2,7)
9	3,29	(s)	3,27	(s)
15	4,66	(d; 3,5)	4,65	(d; 3,4)
16a	1,66	(ddd; 13,0; 3,5; 5,3)	1,59	(ddd; 13,3; 3,4; 5, TR)
16b	1,40	(d; 13,0)	1,99	(d; 13,3)
17	2,43	(d; 5,3)	2,45	(d; 5,3)
18	1,97	(s)	1,99	(s)
19a	4,12	(d; 9,7)	4,13	(d; 9,7)
19b	3,59	(d; 9,7)	3,64	(d; 9,7)
21	5,53	(s)	5,40	(s)
22a	2,33	(dd; 14,5; 3)	2,35	(dd; 14,5; 6,3)
22b	2,02	(d; 14,0)	2,18	(dd; 14,5; 3,5)
23a			5,24	(dd; 3,5; 6,3)
23b	5,24	(d; 5,3)		
28a	4,04	(d; 9,1)	4,04	(d; 9,1)
28b	3,74	(d; 9,1)	3,71	(d; 9,1)

(Fortsetzung von Tabelle A8)

Proton	23 α -Ethoxy-Derivat		23 β -Ethoxy-Derivat	
	¹ H-Res. M, J		¹ H-Res. M, J	
	(ppm)	(Hz)	(ppm)	(Hz)
30	1,71 (s)		1,72 (s)	
OMe	3,76 (s)		3,76 (s)	
OMe	3,66 (s)		3,66 (s)	
OAc	1,90 (s)		1,92 (s)	
Tigloyl:				
3'	6,92 (q;7,1)		6,84 (q;7,1)	
4'	1,75 (d;7,1)		1,75 (d;7,1)	
5'	1,82 (s)		1,82 (s)	
Ethyl:				
CH ₂ a	3,44 (q;7,0)		3,45 (q;7,1)	
CH ₂ b	3,46 (q;7,0)		3,48 (q;7,1)	
CH ₃	1,18 (t;7,0)		1,18 (t;7,1)	
OH	3,54; 4,98; 2,73		2,89; 5,00; 2,54	

Abb.A13. ^1H -NMR-Spektrum von 23 α -Ethoxy-22,23-dihydro-13,14-deepoxy-17-hydroxy-azadirachtin B

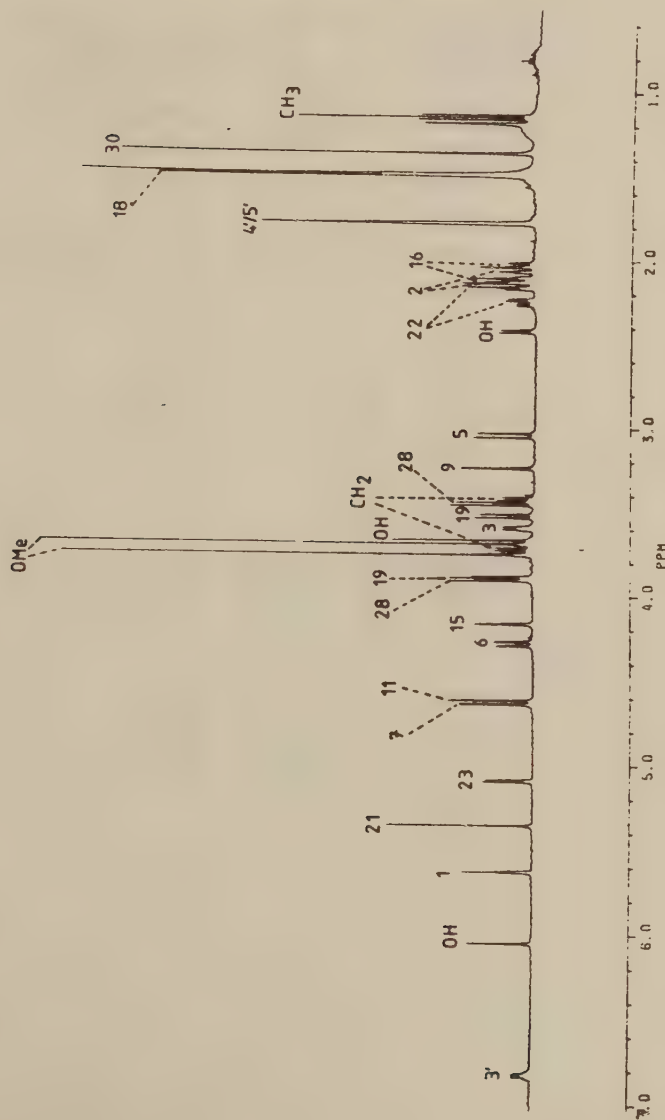


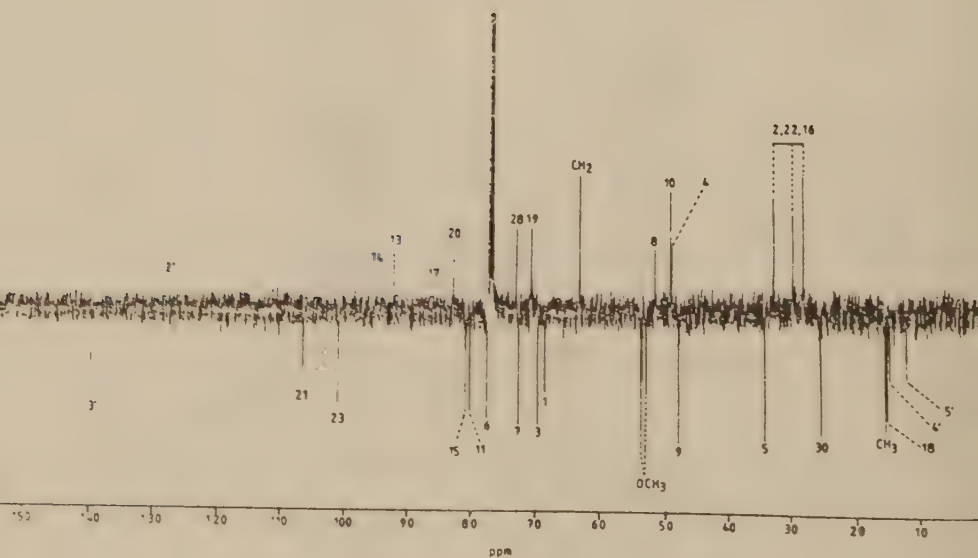
Tabelle A9. Zuordnung der Signale aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von 23 α -Ethoxy-13,14-deepoxy-17-hydroxy-22,23-dihydroazadirachtin B

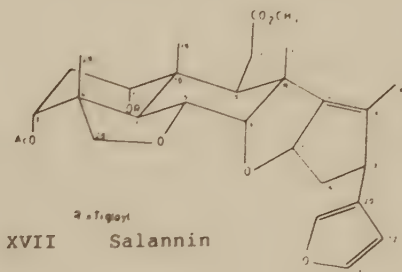
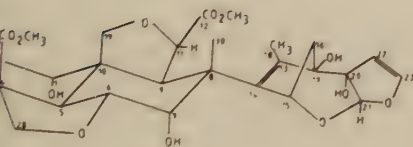
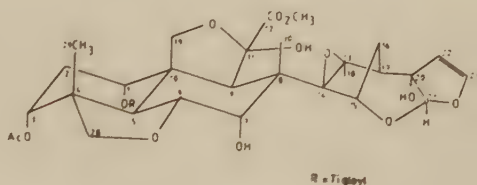
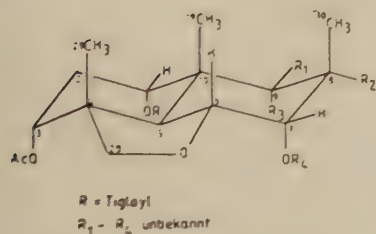
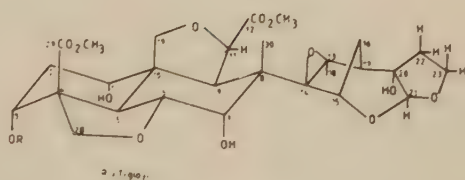
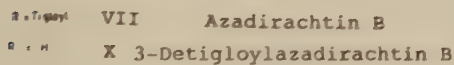
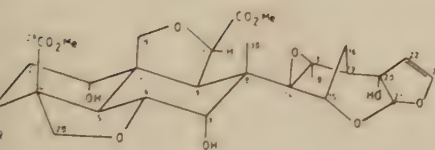
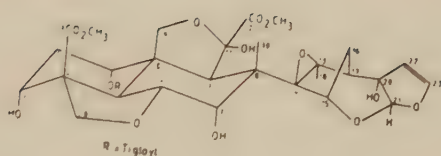
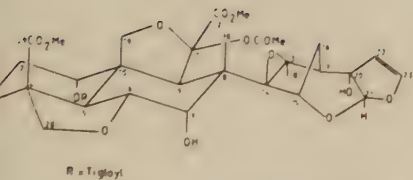
C-Atom	^{13}C -Res. (ppm)	^1H -Res. (ppm)	M, J (Hz)
1	68,3	3,63	(dt, 7,3; 2,8)
2	32,7	a) 2,18 b) 2,09	(dt, 16,0; 2,8) (dt, 16,0; 2,8)
3	69,4	5,62	(t, 2,8)
4	51,3		
5	34,1	3,04	(d, 12,6)
6	77,4	4,28	(dd, 12,6; 2,9)
7	72,4	4,63	(d, 2,9)
8	48,7		
9	47,6	3,24	(d, <1)
10	48,9		
11	80,1	4,61	(d, <1)
12	172,5		
13	92,2		
14	95,0		
15	80,8	4,16	(m)
16	28,0	a) 2,16 b) 2,07	(dd, 13,3; <1) (dd, 13,3; <1)
17	86,5		
18	15,2	1,54	(s)
19	70,6	a) 3,56 b) 3,93	(d, 9,7) (d, 9,7)
20	82,9		
21	106,4	5,39	(s)

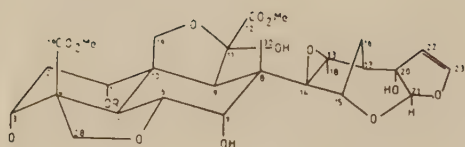
(Fortsetzung von Tabelle A9)

C-Atom	¹³ C-Res. (ppm)	¹ H-Res. (ppm)	M, J (Hz)
22	29,7	a) 2,29 b) 2,19	(dd, 14,5; 5,2) (d, 14,5)
23	100,8	5,12	(d, 5,2)
28	72,9	a) 3,49 b) 3,94	(d, 9,0) (d, 9,0)
29	175,6		
30	25,4	1,40	(s)
OMe	52,6	3,72	(s)
OMe	53,5	3,79	(s)
Tigloyl:			
1'	166,0		
2'	127,5		
3'	139,6	6,85	(q, 7,0)
4'	14,7	1,82	(d, 7,0)
5'	12,2	1,82	(s)
Ethyl an C-23:			
CH ₂	63,0	a) 3,46 b) 3,76	(q, 7,1) (q, 7,1)
CH ₃	15,4	1,19	(t, 7,1)
		OH: 2,46	(d, 7,3) - C1
		6,08	-C17
		3,70	-C7/C20

Abb.A14. ^{13}C -NMR-Spektrum von 23 α -Ethoxy-22,23-dihydro-13,14-deepoxy-17-hydroxy-azadirachtin B, aufgenommen mit DEPT

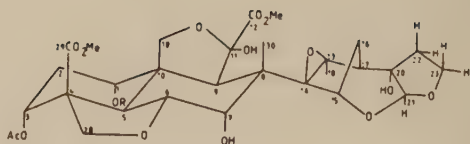






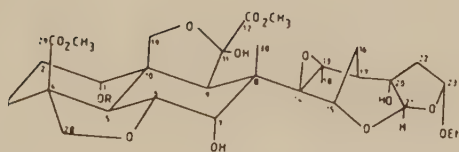
R = Tigloyl

I Azadirachtin A



R = Tigloyl

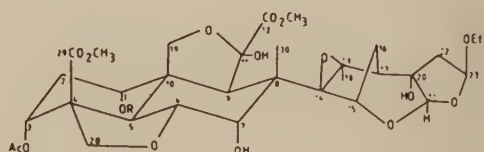
II 22,23-Dihydroazadirachtin A



V

R = Tigloyl

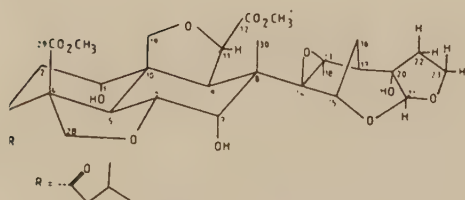
23-Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A



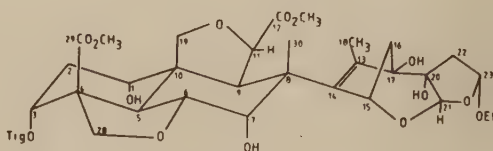
VI

R = Tigloyl

23-β-Ethoxy-22,23-dihydroazadirachtin A



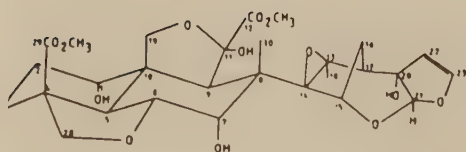
IX 3-Detigloyl-3-(2-methylbutyryl)-
22,23-dihydroazadirachtin B



TigO

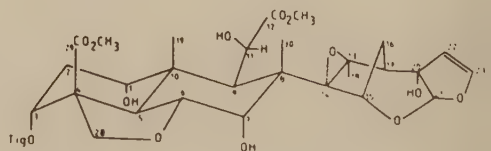
XI

23-α-Ethoxy-22,23-dihydro-13,14-deepoxy
17-hydroxyazadirachtin B



XIV

Azadirachtin E



XV

Azadirachtin F

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Hans Forster
Geburtstag: 06.01.1957
Geburtsort: Bad Tölz
Eltern: Georg Forster
Elfriede Forster, geb. Ettlinger

Ausbildung:

1963 - 1967 Volksschule Bad Heilbrunn
1967 - 1976 Gymnasium Bad Tölz
1977 - 1983 Studium der Chemie an der
Ludwig-Maximilians-Universität
München
1982 - 1986 Anfertigung der Diplom-und Doktorarbeit am
Max-Planck-Institut für Biochemie in
M Martinsried unter der Anleitung
durch Prof.H.Rembold

